



Universidade de Aveiro
2009

Departamento de Biologia

**Sónia Marlene
Rodrigues
Oliveira**

**Efeito das cipselas de *Cichorium intybus* em
ratinhos expostos a CCl₄**



Universidade de
Aveiro

2009

Departamento de Biologia

**Sónia Marlene
Rodrigues Oliveira**

Efeito das cipselas de *Cichorium intybus* em ratinhos expostos a CCl₄

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Helena Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro do Laboratório
Associado CICECO

Apoio financeiro do Laboratório
Associado CESAM

“O mistério não é um muro onde a inteligência esbarra, mas um oceano onde ela mergulha.”

Gustav Thibon

Aos meus pais.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente principal

Professor Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes
professor assistente da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

orientador(a)

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
professora associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

co-orientador(a)

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Agradeço às minhas orientadoras, Prof. Dr.^a M^a de Lourdes Pereira e Prof. Dr.^a Helena Silva pela paciência, pela amizade, pela colaboração... por tudo.

Ao Dr. Américo Freitas, da AVELAB (Aveiro), pela disponibilização de recursos, de tempo, voz amiga e carácter inspirador.

Ao Prof. Dr. Bruno Nunes, da Universidade Fernando Pessoa (Porto), pela simpatia, apoio e introdução aos ensaios de stress oxidativo.

Do Hospital Infante D. Pedro (Aveiro), agradeço à colega de mestrado e amiga, Cristina Soares, pela ajuda, profissionalismo e voz de experiência e a Elsa Dias pelos pequenos deslumbres do mundo da hematologia, pela amizade, curiosidade e apoio desprendido.

Do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro agradeço ao Prof. Dr. Fernando Gonçalves e ao seu grupo pela simpatia e humildade com que nos acolheu, pela sua prestabilidade e paciência constantes. Agradeço, também, toda a disponibilidade de recursos. Ao Prof. Dr. Amadeu Soares e à sua equipa, pelo uso do espectrofotómetro, do homogeneizador e do Microtox. Agradeço, também, à Joanne e à Dr.^a Isabel Lopes a disponibilidade e simpatia demonstradas. À Prof. Dr.^a Sónia Mendo e à sua equipa pelo uso da arca a -80°C e pela atenção e simpatia com que sempre me receberam. À Prof. Dr.^a Adelaide Almeida pela atenção, conselhos e disponibilidade que sempre demonstrou. Ao Prof. Dr. António Nogueira pelas rápidas mas eficazes noções de estatística.

Agradeço aos colegas de laboratório: Cátia Santos, Ricardo Barbosa, Sara Rodrigues; pela ajuda prestada e, em particular, a Filipa Serra e Silva por todo o tempo e esforço dispendido.

A José A. Coelho pela alegria, apoio e apresentação ao SNAKES. E a Sónia Ventura, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, por toda a ajuda prestada com o teste Microtox.

A todas as pessoas que directa ou indirectamente ajudaram à realização do presente trabalho... Obrigada!

palavras-chave *Cichorium intybus*, Fígado, Rim, Baço, Testículo, Epidídimo, Microtox[®], Histopatologia, Stress oxidativo, Tetracloreto de carbono

resumo *Cichorium intybus* é amplamente utilizada na medicina tradicional devido aos seus supostos efeitos hepatoprotectores. Este trabalho teve por objectivo estudar os possíveis efeitos protectores do extracto de cipselas (frutos) de *C. intybus* no fígado, rim, baço, testículo e epidídimo de ratinhos. Realizaram-se análises histopatológicas e bioquímicas. Os efeitos protectores destas cipselas foram estudados por comparação com os controlos negativo e positivo, NaCl 0,9% e CCl₄ em duas doses (1,5 ml/kg e 1,0 ml/kg), respectivamente. O estudo de toxicidade do extracto esterilizado, com a bactéria *Vibrio fischeri* (Microtox[®]), revelou maior potencial tóxico aquando da diminuição do diâmetro do poro de filtração. Foi usada a dose de 25 mg de extracto/kg de ratinho nos estudos *in vivo*. Os ensaios bioquímicos não permitem concluir sobre o efeito antioxidante do extracto, dado o número de animais utilizados e a heterogeneidade de resultados. Histologicamente, os efeitos do CCl₄ no fígado, quando administrado *a posteriori*, foram atenuados pelo extracto vegetal. Este não revelou efeito regenerador ou protector relevante no rim ou no baço. O extracto provocou alterações histológicas relevantes no testículo e no epidídimo. Contudo, não se observou alteração significativa no diâmetro dos túbulos seminíferos. O extracto revelou-se eficaz ao nível do tecido sanguíneo. O extracto provocou efeitos diferentes nos vários órgãos estudados e consoante a exposição a diferentes concentrações de tóxico. Os potenciais efeitos protectores e/ou regeneradores do extracto de cipselas (frutos) de *C. intybus* deverão futuramente ser investigados, através de novas técnicas.

keywords

Cichorium intybus, Liver, Kidney, Spleen, Testis, Epididymis, Microtox[®], Histopathology, Oxidative Stress, Carbon tetrachloride

abstract

Cichorium intybus is widely used on traditional medicine due to its supposed protective effects on the liver. The aim of this study was to investigate the possible effects of *C. intybus*' fruits extract on liver, kidneys, spleen, testis, and epididymis of mice. Histopathological and biochemical analysis were conducted. The protective effects of these fruits were studied by comparison with the negative and the positive controls made with NaCl 0,9% and CCl₄ (both 1,5 ml/kg and 1,0 ml/kg dosages), respectively. A previous Microtox[®] assay of the herbal extract showed higher toxic potential as the filter pore diameter decreases. The dosage of 25 mg/kg was used in the *in vivo* studies. In the biochemical assays, the diversity of the results and the number of animals studied didn't allow any conclusions about the antioxidant potential of the extract. Histologically, the extract was more efficient in diminish the effects of the CCl₄ when administered afterwards. The kidney and the spleen sections didn't reveal evident recovery. The extract caused considerable lesions in the testis and epididymis. Though, no significant modifications of the seminiferous tubules diameter were detected. The extract was efficient on the blood smear. The extract caused different effects in the several studied organs and according to the CCl₄ dosage used. The potential protective and/or regenerative effects of the *C. intybus* fruits' extract should be studied using new methods.

Índice

Capítulo I – Introdução	15
I.1. Importância das Plantas Medicinais.....	15
I.1.1. Plantas Medicinais e o fígado.....	15
I.2. <i>Cichorium intybus</i> como planta medicinal.....	16
I.2.1. Composição química.....	18
I.2.2. Actividades biológicas e farmacológicas	18
I.3. Órgãos em estudo	19
I.3.1. Fígado.....	19
I.3.1.1. Doenças hepáticas.....	20
I.3.2. Rim	21
I.3.3. Baço.....	22
I.3.4. Testículo e Epidídimo	23
I.4. Estudos de Toxicidade	24
I.4.1. Tetracloreto de Carbono (CCl ₄) como agente tóxico	24
I.4.2. Metabolismo de tóxicos: o citocromo P ₄₅₀	24
I.4.3. Avaliação da toxicidade de extractos: teste Microtox	25
I.4.4. Marcadores sanguíneos de toxicidade	25
I.4.5. Stress Oxidativo.....	27
I.4.5.1. Defesas antioxidantes	28
I.5. Objectivos.....	29
Capítulo II – Material e Métodos	31
II.1. Preparação do Extracto Vegetal	31
II.2. Preparação de Soluções	31
II.3. Teste Microtox.....	32
II.4. Animais, Tratamento e Sacrifício	32
II.5. Estudos Histológicos	33
II.6. Estudos Hematológicos.....	34
II.7. Stress Oxidativo	34

II.7.1. Determinação da actividade da Catalase	35
II.7.2. Quantificação da glutathione S-transferase	35
II.7.3. Doseamento de proteínas.....	36
II.8. Análise Estatística	36
Capítulo III – Resultados e Discussão.....	38
III.1. Efeitos do extracto em <i>Vibrio fischeri</i>	38
III.2. Sobrevivência e comportamento.....	40
III.3. Evolução do peso corporal e rácios	40
III.4. Aspecto macroscópico dos órgãos	43
III.5. Estudos Hematológicos	44
III.5.1. Análises do soro sanguíneo	44
III.5.2. Esfregaço Sanguíneo	46
III.6. Stress oxidativo	47
III.6.1. Catalase (CAT)	47
III.6.2. Glutathione-S-transferase (GST).....	49
III.7. Observação histopatológica.....	50
III.7.1. Fígado.....	50
III.7.2. Rim	55
III.7.3. Baço.....	59
III.7.4. Testículo.....	61
III.7.4.1. Diâmetro dos túbulos seminíferos.....	62
III.7.5. Epidídimo	63
Capítulo IV – Discussão geral e Conclusões	66
Capítulo V – Perspectivas Futuras.....	68
Capítulo VI - Referências Bibliográficas.....	70

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>C. intybus</i> L. em floração (Aveiro, Portugal).....	17
Figura 2 - Fruto (cipsela) de <i>C. intybus</i> contendo uma semente.....	17
Figura 3 - Anatomia macroscópica do fígado em vista posterior.....	20
Figura 4 - Esquerda: corte esquemático do rim. Direita: Localização cortical e medular dos componentes do nefrónio. ³⁸	22
Figura 5 - Fluxograma indicando as várias causas associadas ao aumento dos níveis serológicos de aminotranferases. ³⁷	26
Figura 6 - Curva efeito/concentração obtida no teste Microtox com extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> (sem filtração pós-extracção).....	38
Figura 7 - Curva efeito/concentração obtida no teste Microtox com extractos de cipselas de <i>C. intybus</i> (esquerda: filtrado com poro de 0,45µm de diâmetro; direita: filtrado com poro de 0,2µm de diâmetro).....	39
Figura 8 - Evolução da massa corporal dos ratinhos dos diferentes grupos (g), ao longo do trabalho experimental.....	40
Figura 9- Efeitos do extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> em toxicidade induzida por CCl ₄ , nas actividades da Alb e da TP. (A) Alb. (B) TP. Valores expressos em termos de média ± desvio-padrão. Grupos: de acordo com a Tabela 1.....	45
Figura 10- Efeitos do extracto de cipselas de chicória em hepatotoxicidade induzida por CCl ₄ , no esfregaço sanguíneo. (A) NaCl. (B e C) CCl ₄ 1,0 ml/kg. A _t = 1000x.....	46
Figura 11 - Tendência observada para a actividade da CAT nos diferentes grupos. Valores representados em termos de média ± desvio-padrão. (A) Fígado; (B) Rim. Grupos: (1) NaCl 0,9%; (2) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (3) CCl ₄ [1,5 ml/kg] + Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (4) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg] + CCl ₄ [1,5 ml/kg]; (5) CCl ₄ [1,0 ml/kg] + Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (6) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg] + CCl ₄ [1,0 ml/kg].....	48
Figura 12 - Tendência observada para a actividade da glutathione-S-transferase (GST) nos diferentes grupos. Valores representados em termos de média ± desvio-padrão. (A) Fígado; (B) Rim. Grupos: de acordo com a Tabela 1.	49
Figura 13 - Efeito dos compostos a seguir indicados na histologia hepática (HE, 100 x & 400x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (C) CCl ₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl ₄ [1,0 ml/kg].	51

Figura 14 - Efeito do extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> na histologia hepática, em intoxicação por CCl ₄ . (HE, 400x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.	53
Figura 15 - Efeito dos compostos a seguir indicados no fígado (TM, 1000 x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (C) CCl ₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl ₄ [1,0 ml/kg].	54
Figura 16 - Efeito do extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> no fígado, em intoxicação por CCl ₄ . (TM, 1000 x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.	55
Figura 17 - Efeito dos compostos a seguir indicados nas fibras renais (HE, 400 x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (C) CCl ₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl ₄ [1,0 ml/kg].	56
Figura 18 - Efeito do extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> nas fibras renais, em intoxicação por CCl ₄ . (HE, 400x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.	57
Figura 19 - Efeito dos compostos a seguir indicados nas fibras renais (TM, 100 x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (C) CCl ₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl ₄ [1,0 ml/kg].	58
Figura 20 - Efeito do extracto de <i>C. intybus</i> nas fibras renais, em intoxicação por CCl ₄ (TM, 100 x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.	59
Figura 21 - Efeito das substâncias a seguir indicadas, na histologia do baço (HE, 400 x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (C) CCl ₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl ₄ [1,0 ml/kg].	60
Figura 22 - Efeito do extracto cipselas de <i>C. intybus</i> na histologia do baço, em intoxicação por CCl ₄ (HE., 400 x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.	61
Figura 23 - Efeito das substâncias a seguir indicadas, na histologia do testículo (HE., 400x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (C) CCl ₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl ₄ [1,0 ml/kg].	62
Figura 24 - Efeito dos diferentes tratamentos no diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais dos vários grupos. Os valores correspondem a média ± desvio-padrão com n=5 (n=1 no grupo 7). * Significativamente diferentes do grupo 5 (p ≤ 0,05).....	63
Figura 25 - Efeito das substâncias a seguir indicadas, na histologia do epidídimo (HE, 400x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]; (C) CCl ₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl ₄ [1,0 ml/kg].	64

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Esquema dos grupos usados e respectivo tratamento. 33

Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos no rácio dos órgãos dos animais dos vários grupos. 41

Tabela 3- Efeitos do extracto de cipselas de chicória nas actividades das transaminases séricas sanguíneas..... 44

Abreviaturas

Alb	Albumina Total
ALT	Alanina Aminotransferase (= SGPT)
AST	Aspartato Aminotransferase (= SGOT)
CAT	Catalase
CCl₄	Tetracloroeto de Carbono
CYP	Citocromo P ₄₅₀
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GR	Glutationa Reductase
GSH	Glutationa – forma reduzida
GSSG	Glutationa – forma oxidada
GST	Glutationa – S – Transferase
HE	Hematoxilina e Eosina
H₂O₂	Peróxido de Oxigénio
RNS	Espécies reactivas de nitrogénio (azoto)
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SGOT	Transaminase glutâmica oxaloacética sérica
SGPT	Transaminase glutâmico pirúvica sérica
TM	Tricrómio de Masson
TP	Proteína Total

Capítulo I – INTRODUÇÃO

Capítulo I – Introdução

I.1. Importância das Plantas Medicinais

O uso das plantas medicinais começou de forma empírica. Com o isolamento dos constituintes químicos de actividade farmacológica e a sua síntese química a utilização destas plantas diminuiu pensando-se que fosse desaparecer nos países ocidentais. No entanto, no final do século XX, as plantas medicinais adquiriram renovado e exponencial interesse, bem como novas formas de aplicação (tinturas, cápsulas, etc.).¹ A popularidade destas plantas tem aumentado devido à sua eficácia, aos reduzidos efeitos secundários e ao custo relativamente baixo, embora os seus componentes biológicos activos sejam pouco conhecidos.²

É necessário maior conhecimento dos potenciais benefícios das plantas medicinais, dos seus efeitos secundários e das suas interacções com outras drogas. A falta de fórmulas padronizadas de preparação dos extractos, a heterogeneidade das populações e a incerteza dos princípios activos presentes explicam as incongruências entre os estudos publicados e dificultam a sua interpretação. Adicionalmente, a hepatotoxicidade constitui um sério efeito secundário de algumas ervas medicinais.^{3,4}

Os efeitos das plantas medicinais podem resultar de um único mecanismo ou de um conjunto de interacções entre os seus princípios activos. Normalmente, os efeitos de interesse farmacológico são obtidos usando toda a planta ou extracto. Logo, é nestas preparações que nos devemos centrar, sendo importante compreender os efeitos dos compostos activos em conjunto e individualmente.⁵

I.1.1. Plantas Medicinais e o fígado

O fígado é a maior glândula do corpo humano e local de intenso metabolismo, secreção e excreção. Está constantemente exposto a uma grande variedade de xenobióticos, poluentes e agentes quimioterapêuticos.⁶ Os fármacos tradicionais usados no tratamento das doenças hepáticas são, por vezes, inadequados e podem provocar efeitos adversos. Por isso, actualmente, procuram-se compostos alternativos.⁶

O uso das plantas medicinais baseia-se na experiência e na prática mantendo-se o debate sobre o seu uso no tratamento de problemas de saúde humana. As plantas

contêm compostos com utilidade farmacológica (princípios activos) mas, também podem conter substâncias tóxicas^{7,8} ou estar contaminadas com químicos, compostos metálicos e microrganismos.^{9,10}

Estudos prévios indicaram alguns extractos vegetais, nomeadamente as sementes secas de *Silybum marianum*, como inibidores dos processos patológicos e protectores dos hepatócitos.^{11,12} No entanto, outros extractos, como o da folha de *Larrea tridentata* foram associados a hepatites, a necroses hepáticas e a insuficiências hepáticas.⁸

Em face da bibliografia disponível podemos referir que ainda não se encontrou um produto totalmente satisfatório para o tratamento de doenças hepáticas graves; a maioria das ervas usadas aceleram o processo de regeneração natural do fígado e há também que considerar a concentração/dose dos extractos, os sinergismos dos compostos presentes nos mesmos e a susceptibilidade individual de cada pessoa. Assim, a busca por uma droga hepatoprotectora eficaz continua.

I.2. *Cichorium intybus* como planta medicinal

Cichorium intybus L. (Figura 1), vulgarmente chamada de chicória, cresce espontaneamente em Portugal. É uma erva vivaz da família Compositae, de raiz comprida e grossa e caule ramoso com 30-120cm. Apresenta folhas basilares oblanceoladas, roncínado-penatífendidas a dentadas, curtamente pecioladas; as caulinares inteiras ou com poucos dentes, sésseis e semiamplexicaules. As lígulas (flores) são azul-vivo, raramente rosadas ou brancas, 3 vezes tão compridas como o involúcro; cipselas (fruto) com 2-3mm, irregularmente angulosas e acastanhadas. Surge em terrenos cultivados e incultos, também ruderal e, por vezes, cultivada como sucedâneo do café (café de chicória).¹³



Figura 1 – *C. intybus* L. em floração (Aveiro, Portugal).



Figura 2 – Fruto (cipsela) de *C. intybus* contendo uma semente.

As sementes de *C. intybus* são componentes de muitas fórmulas poli-herbais usadas em doenças hepáticas.¹⁴ É vulgarmente usada como tónico cerebral, cardiotónico, diurético, depurativo, no tratamento de cefaleias, inflamações, anorexia, flatulência, cólicas, inchaço hepático, entre outras enfermidades.^{15, 16}

A raiz é a parte mais medicinalmente activa da planta, melhorando a circulação e ajudando a eliminar possíveis concentrações de lípidos e de toxinas dos vasos sanguíneos, enquanto a inulina presente ajuda a diminuir a pressão arterial. A decocção da raiz mostrou ser benéfica no tratamento de icterícia, inchaço hepático, gota e reumatismo. O seu suco é referido como tratamento tradicional para cancro do útero e tumores.¹⁷

I.2.1. Composição química

As raízes de *C. intybus* possuem teores apreciáveis de pentoses, levuloses e dextroses e de taraxacina (substância amarga também presente no dente-de-leão - *Taraxacum officinale*). A inulina, um oligossacarídeo que tem pouco impacto na glicemia sanguínea, constitui mais de 40% da raiz. Identificaram-se outros sacarídeos, flavonóides (antocianinas, flavonóis, flavonas), óleos essenciais e metoxi-cumarina-cichorina nas flores. Também foram encontrados outros compostos em *C. intybus*, como pigmentos (antocianinas), taninos, sesquiterpenos, lactonas, cumarinas e derivados do ácido cinâmico (como o ácido chicórico e os ácidos clorogénico e caféico).¹⁷ Em 2002¹⁸ foi identificado um novo seco-esterol – cichosterol – e um esteroide raro (σ -5(6)-ene-3- α -O-(β -D-glucopiranosida)) nas sementes de *C. intybus*.

Todas as partes da chicória possuem óleos voláteis idênticos aos encontrados no género *Tanacetum*, um eficaz eliminador dos vermes intestinais, com a maioria dos componentes tóxicos concentrados na raiz.¹⁹ Dos compostos voláteis identificados em *C. intybus*, os mais preponderantes são hidrocarbonetos alifáticos e seus derivados. Em menor quantidade surgem os terpenóides.¹⁷

I.2.2. Actividades biológicas e farmacológicas

Vários autores referem a actividade antibacteriana, anti-fúngica, anti-malária, citotóxica, anti-diabética e não-mutagénica, entre outras, de *C. intybus*.^{17, 20, 21}

O extracto da raiz possui princípios activos hepatoprotectores e actua como potencial inibidor de tumores.^{22, 23} No macerado de *C. intybus* foram identificados compostos antioxidantes e pró-oxidantes e compostos hidrossolúveis capazes de contrariar a peroxidação lipídica.^{24, 25} Extractos desta planta demonstraram ter efeitos protectores nos danos hepáticos induzidos pela tioacetamida e influenciar o metabolismo lipídico e o balanço *redox* do tecido pancreático de ratos com dislipidemia experimental.^{26, 27} Também o extracto de folhas secas de *C. intybus* revelou protecção cardíaca ao stress oxidativo, com activação da catalase e diminuição da peroxidação lipídica.²⁸ As sementes de *C. intybus* foram também sugeridas como hepatoprotectoras e, em particular, o “cichotibosídeo” existente nestas.^{29, 30}

Compostos, como os derivados de polifenóis, podem ser responsáveis pelas propriedades antioxidantes desta espécie.²⁶ Assim, Conforti *et al* (2008)³¹ sugerem a utilização de *C. intybus* em combinação com outras terapias anti-cancerígenas.

Muthusamy *et al* (2008)³² observaram a redução dos níveis de glicose sanguínea sem indução da adipogénese pelo extracto metanólico de folhas desta planta e Tusch *et al* (2008)³³ referem o papel do ácido chicórico no tratamento da diabetes tipo 2.

Jamshidzadeh *et al* (2006)³⁴ observaram os efeitos tóxicos do extracto hidro-alcoólico de folhas de *C. intybus*, *in vitro* e *in vivo*. Outros autores reafirmaram a necessidade de conhecimento dos princípios activos do extracto.³⁵

Alguns dos constituintes desta planta, como as lactonas sesquiterpénicas, têm o potencial de produzir efeitos tóxicos.³⁶ No entanto, Schmidt *et al* (2007)³⁶ não encontraram evidências da toxicidade destas lactonas, sugerindo o uso do extracto de raiz de *C. intybus* como agente terapêutico para doenças inflamatórias.

I.3. Órgãos em estudo

No presente trabalho foram estudados alguns tecidos e órgãos a seguir mencionados.

I.3.1. Fígado

A organização funcional do fígado reflecte-se nas suas funções. Uma das funções mais relevantes do fígado envolve a degradação de aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos e vitaminas e seu armazenamento, conversão metabólica e libertação para o sangue. Muitas das funções do fígado estão interligadas, o que se torna evidente quando surgem anormalidades no fígado, dado que muitas de suas funções são afectadas simultaneamente.³⁵

Anatomicamente, o fígado apresenta dois lobos principais, direito (6 vezes maior) e esquerdo, e dois lobos menores – Figura 3.

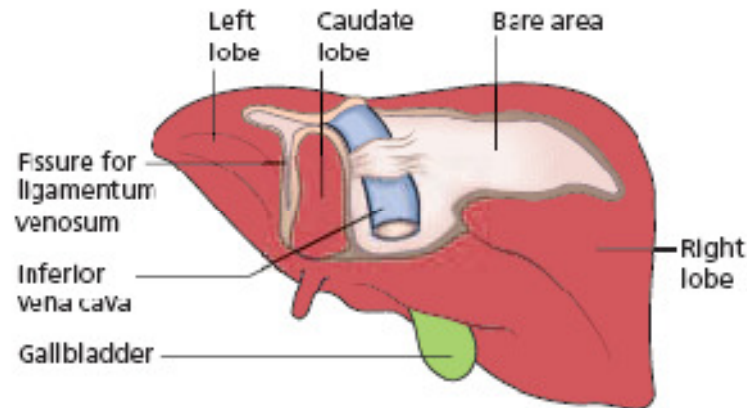


Figura 3 – Anatomia macroscópica do fígado em vista posterior.³⁷

Septos de tecido conjuntivo dividem o fígado em lóbulos hepáticos hexagonais, visíveis em algumas espécies, como no caso dos suínos, incluindo no centro a veia centrolobular. Em cada vértice existe um espaço porta, contendo um ramo da veia porta (conduz o sangue do estômago, intestinos e baço), um da artéria hepática (traz sangue arterial) e um ducto hepático (transporta a biliar), encontrando-se aí também nervos e vasos linfáticos. Radialmente, dispõem-se cordões de hepatócitos. Estes estão separados por capilares sinusóides contendo células endoteliais e de Kupffer. No espaço perissinusoidal (espaço de Disse), existem lipócitos (células estreladas, ou células de Ito), que armazenam lípidos e acumulam vitamina A. Em resposta a uma lesão hepática, estas células podem proliferar tornando-se contrácteis e produzindo fibras de colagénio. Desempenham um papel principal na fibrose, com progressiva desorganização do parênquima que caracteriza a cirrose.³⁵ Entre os sinusóides e os hepatócitos localiza-se o espaço de Disse, preenchido com plasma o que dá aos hepatócitos acesso directo às moléculas em circulação que passam pelos grandes poros sinusóides ou pelas descontinuidades do endotélio. Neste espaço, projectam-se microvilosidades dos hepatócitos e existe uma rede de fibras reticulares. Ambos servem de suporte ao endotélio dos sinusóides. O sangue que percorreu o fígado é drenado para as veias supra-hepáticas que desembocam na veia cava inferior.³⁸

I.3.1.1. Doenças hepáticas

O fígado é um órgão de importância primordial. Danos a nível hepático, a longo prazo, resultam em fibrose, cirrose e em carcinoma hepatocelular.¹¹

A eficácia dos tratamentos com interferões, penicilamina e corticosteróides é inconsistente e tem graves efeitos secundários.³⁹ Os xenobióticos sofrem biotransformações no fígado, catalisadas por sistemas enzimáticos microsossomais.⁴⁰ A principal enzima de bioactivação, das enzimas do citocromo P₄₅₀, é a CYT2E1, que também está envolvida na toxicidade hepática provocada pelo CCl₄. A inibição desta isoenzima por inibidores específicos ou por extractos vegetais provou ser hepatoprotectora. O processo de biotransformação das drogas gera vários derivados reactivos e oxidantes. Estes podem-se ligar e/ou reagir com componentes celulares hepáticos e provocar danos, conduzindo à perda de funções.⁴⁰

Na ausência de medicamentos hepáticos completamente eficazes, as plantas desempenham um importante papel no tratamento de várias doenças hepáticas.⁴¹ A inibição da CYT2E1 e a acção dos antioxidantes são sugeridas como mecanismo de acção comum nos tratamentos herbais.⁴⁰

I.3.2. Rim

Os rins controlam a concentração de electrólitos e o volume de água no organismo, excretam os produtos metabólicos, produzem hormonas (eg. eritropoietina) e desempenham algumas actividades metabólicas (eg. controlo insulínico e do pH).⁴² A unidade funcional e estrutural do rim é o nefrónio. O córtex renal é facilmente identificado pela presença dos abundantes corpúsculos renais – ausentes na medula. A restante porção do córtex é ocupada pelos túbulos contornados proximais e distais e ductos colectores que formam os chamados raios medulares. A medula consiste de ansas de Henle, de túbulos colectores e de ductos.

Os processos patológicos do rim podem resultar de várias causas, muitas das quais comuns a outros sistemas (infecções, tumores, problemas vasculares, reacções a drogas, etc.). O rim é particularmente atreito a doenças auto-imunes comparativamente a outros órgãos e está afectado no progresso de muitas doenças metabólicas, principalmente, a diabetes.⁴³

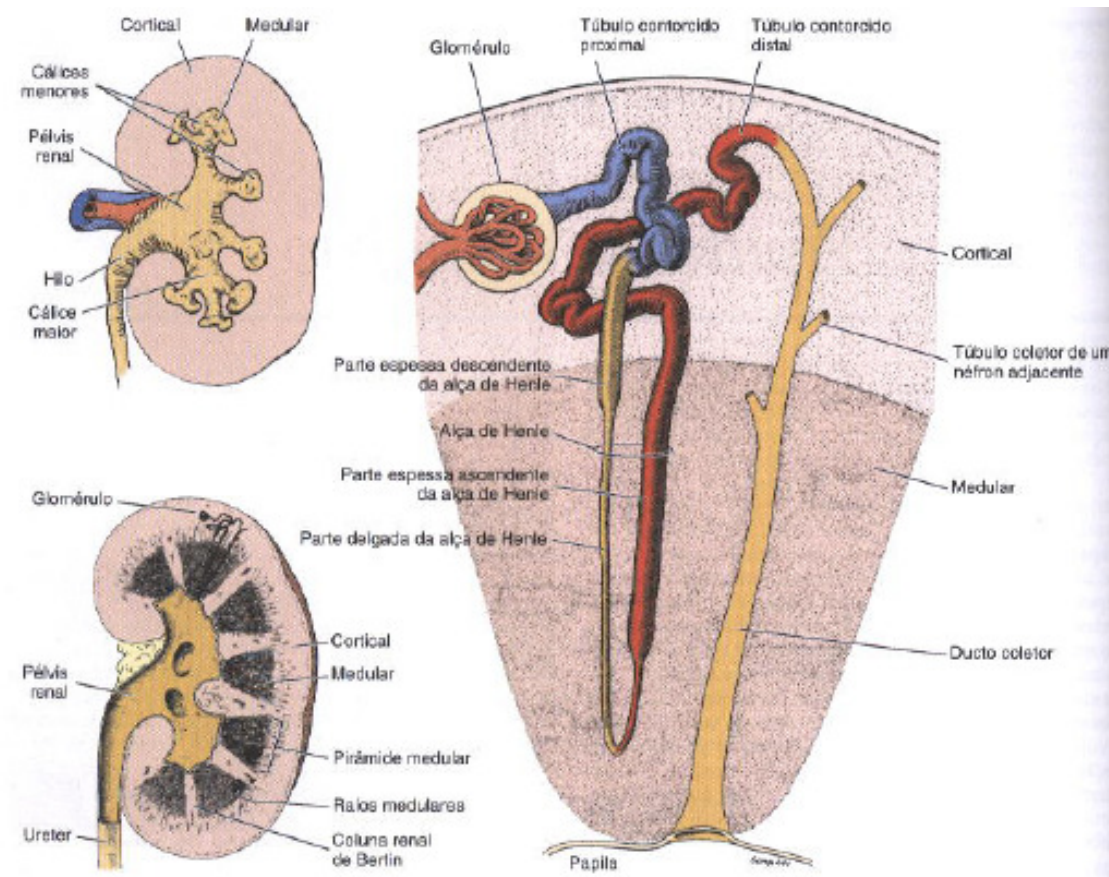


Figura 4 – Esquerda: corte esquemático do rim. Direita: Localização cortical e medular dos componentes do nefrônio.³⁸

I.3.3. Baço

O baço é um órgão que está envolvido na resposta imunitária. Da sua cápsula partem trabéculas de tecido fibroelástico, fibras musculares lisas e veias, que atravessam o tecido linfóide disposto em folículos (corpúsculos de Malpighi), de forma arredondada e com uma arteríola, normalmente excêntrica. O conjunto destes folículos forma a polpa branca, um centro germinativo com linfócitos, linfoblastos e macrófagos. As trabéculas contêm vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Os linfócitos migram para os nódulos linfáticos através destes vasos linfáticos eferentes. A polpa branca está embebida numa matriz designada por polpa vermelha. Este órgão recebe o sangue oxigenado através da artéria esplénica. Este é, depois, drenado pela veia esplénica para o sistema-porta hepático.⁴⁴

A polpa vermelha filtra o sangue, sendo também local de reserva de ferro, eritrócitos e plaquetas e local de hematopoiese nos roedores. A polpa branca inicia as

respostas imunes à presença de antigénios e é constituída por três zonas: manto linfóide periarteríolar (PALS), folículos e zona marginal.^{42, 44}

Além das diferenças entre espécies, também a idade e mutações genéticas podem afectar a morfologia deste órgão.⁴⁴

1.3.4. Testículo e Epidídimo

No interior do testículo, envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea, situam-se os tubos seminíferos. Entre os vários túbulos existe tecido conjuntivo com fibroblastos, vasos (arteríolas e vénulas), nervos, vasos linfáticos e as células intersticiais ou de Leydig, habitualmente dispostas em grupo (células de grandes dimensões, redondas ou poligonais, com citoplasma muito eosinófilo, nas preparações coradas com HE). Cada túbulo é rodeado por tecido conjuntivo denso, com fibroblastos achatados, formando uma lâmina própria. O epitélio seminífero é composto por células somáticas ou de Sertoli (altas e delgadas) e pela linhagem de células germinativas.³⁸

A espermatogénese ocorre de forma ordenada, permitindo identificar várias fases em cada túbulo seminífero. As células germinativas completam uma série de divisões ao longo do seu desenvolvimento e deslocam-se da base do túbulo para o lúmen, onde sofrem grandes alterações morfológicas (Espermiogénese). Os espermatozóides (não móveis) são então transportados do lúmen tubular do testículo para o epidídimo, onde se tornam móveis por combinação de secreção e movimento do fluído.³⁸

O epidídimo distingue-se do testículo pelo epitélio simples, pseudo-estratificado, formado por células cilíndricas altas e com grandes cílios imóveis (estercílios), e por células redondas basais escassas.⁴³

A espermatogénese prossegue num ambiente quimicamente controlado e imunologicamente privilegiado mantido por uma barreira semelhante à barreira hemato-encefálica. A passagem das substâncias químicas por esta barreira é muito restrita mas em alguns casos estas substâncias atravessam a mesma e conseguem penetrar no lúmen dos tubos seminíferos, sendo transportadas no fluído tubular ou ductal. Desconhece-se o papel do testículo como local de metabolismo substâncias químicas. Ainda não foram identificados marcadores bioquímicos de danos testiculares, pelo que a avaliação morfológica e funcional das alterações toxicológicas neste órgão se reveste de especial importância. O uso e previsibilidade das medições de contagem espermática, morfologia e mobilidade dos

espermatozóides, é limitado e apesar dos testes de fertilidade serem o teste final de normalidade funcional, estão entre os menos sensíveis nas espécies de roedores.⁴² Muitas substâncias, inclusive produtos derivados de plantas e suplementos alimentares, podem afectar o sistema endócrino e ter um efeito tóxico no sistema reprodutivo. Existe, também, uma procura crescente de agentes de origem vegetal com acção contraceptiva.⁴⁵

I.4. Estudos de Toxicidade

I.4.1. Tetracloreto de Carbono (CCl₄) como agente tóxico

O CCl₄ induz, no fígado, a cirrose, a necrose e o chamado “fígado gordo”. Estes efeitos são devidos à formação de intermediários reactivos como os radicais livres triclorometil (CCl₃·) metabolizados pelo CYP, no retículo endoplasmático, e à oxidação das proteínas hepáticas.^{46, 47}

A sensibilidade especial do fígado para o composto advém da presença, em grande quantidade, das enzimas que o metabolizam (CYP2E1), particularmente a nível centrilobular. Esta enzima é a principal responsável pela metabolização do composto mas existem outras que o fazem quando a dose de exposição é mais elevada (CYP3A).⁴⁸ Os metabolitos reactivos gerados pela oxidação enzimática do composto provocam vários danos celulares: ataque directo de radicais a proteínas, peroxidação lipídica e alteração dos níveis intracelulares de cálcio. A extensão do dano hepático dependerá de vários factores tais como a indução do CYP, a presença de antioxidantes e as interacções com outros produtos químicos.⁴⁸

Nas concentrações em que ocorrem danos hepáticos, também ocorrem danos renais.⁴⁸ O índice de CYP nas células tubulares renais (10-20% do existente no fígado) faz com que estas estejam sujeitas á acção tóxica do composto.^{42, 48}

I.4.2. Metabolismo de tóxicos: o citocromo P₄₅₀

Os ratinhos são um dos principais modelos usados, tendo prestado grande contributo para a saúde humana. Porém, os cerca de 65 milhões de anos que separam a evolução das duas espécies justificam a existência de diferenças entre si. Contudo, muitos mecanismos e sistemas biológicos são idênticos nas duas espécies.⁴⁹

No metabolismo do CCl_4 , os hamsters foram mais eficientes a metabolizar o CCl_4 do que os ratinhos, os ratos ou os humanos.⁵⁰ No entanto, a principal enzima que metaboliza o CCl_4 – CYP2E1 – é bastante conservada entre espécies. Esta enzima tem um papel fisiológico duplo, a nível de desintoxicação e de suporte nutricional.⁵¹ Estudos sugerem que a inibição do CYP2E1, que está envolvido na biotransformação do CCl_4 , diminui a hepatotoxicidade do CCl_4 .⁵² Por outro lado, a CYP3A, também relevante no metabolismo de xenobióticos, tem pouca especificidade de substratos, sendo altamente estimulável e podendo ser inibida por várias drogas. As diferenças inter-específicas são substanciais em termos de isoformas, expressão, especificidade para o substrato/órgão e actividade catalítica dificultando a extrapolação de resultados dos modelos para os humanos.⁵¹

I.4.3. Avaliação da toxicidade de extractos: teste Microtox

O teste de inibição de bioluminescência da *Vibrio fischeri* (antigamente conhecida por *Photobacterium phosphoreum*) ou Microtox®, um teste rápido, eficaz e reprodutível para avaliar a toxicidade de várias substâncias, baseia-se no uso duma suspensão de *V. fischeri* em solução salina (para proteger a bactéria de danos osmóticos) e quantifica a redução da emissão de luz aquando da exposição ao tóxico em estudo. Este processo está interligado ao metabolismo microbiano e, portanto, directamente ligado ao efeito tóxico da substância na bactéria.

Fort (1992)⁵³ e Kaiser *et al* (1994)⁵⁴ concluíram existir boa correlação entre os valores de EC_{50} do Microtox e os de LD_{50} em ratinhos. A correlação era maior na administração intravenosa, seguindo-se a injeção intraperitoneal e a via oral. Em 1998, Kaiser⁵⁵ afirmou a possibilidade de extrapolação deste teste para outros organismos, consoante a complexidade química da molécula em estudo. No entanto, Burton *et al* (1986)⁵⁶ referem a maior sensibilidade do Microtox em relação a testes de toxicidade aguda *in vivo* em ratinhos e a testes *in vitro*.

I.4.4. Marcadores sanguíneos de toxicidade

São necessários testes para detectar doenças, estimar a sua gravidade, fazer prognósticos e estudar o melhor tratamento. A extensão de desorganização hepática é, normalmente, medida através dos níveis de alanina aminotransferase (ALT ou

SGPT), aspartato aminotransferase (AST ou SGOT), fosfatase alcalina (ALP), bilirrubina e albumina.³⁷

A AST é uma enzima mitocondrial presente em elevados teores no coração, fígado, músculo-esquelético e rim. Os seus níveis aumentam quando estes tecidos são lesados. A ALT é uma enzima citosólica presente nos hepatócitos. Apesar de a sua quantidade absoluta ser inferior à da AST, é mais específica de danos hepáticos do que a AST.

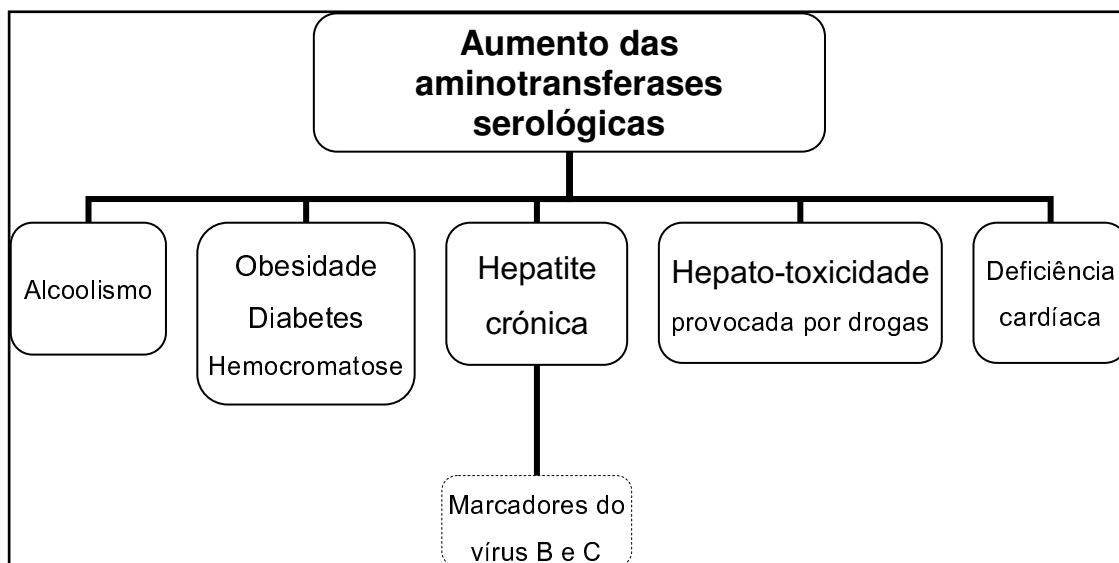


Figura 5 - Fluxograma indicando as várias causas associadas ao aumento dos níveis séricos de aminotranferases.³⁷

Uma das proteínas plasmáticas sintetizada no hepatócito é a albumina. A sua síntese está reduzida nas alterações hepáticas como, por exemplo, a cirrose.³⁷ Portanto, a ALT e a AST funcionam como indicadores bioquímicos séricos de inflamação hepática enquanto a proteína total e a albumina indicam regeneração celular.⁵⁷

Vários xenobióticos originam metabolitos de reactividade intermédia, que permitem o seu transporte para tecidos distantes do local primário de metabolismo (i.e. do fígado para a medula óssea). Apesar do metabolismo dos compostos decorrer, predominantemente, no fígado, os principais metabolitos da sua decomposição podem possuir tempos-médios de vida relativamente longos. Tal acaba por se manifestar a nível do número e função das células sanguíneas em circulação.⁴² Assim, as doenças hepáticas podem originar diminuição da sobrevivência eritrocitária, anemia, alterações na membrana das hemácias, leucopenia, trombocitopenia e coagulopatias, com hemorragias espontâneas. A doença hepática

crónica é também, normalmente, acompanhada por “hiperesplenismo”, acompanhado de um aumento da destruição das hemácias no baço.³⁷

I.4.5. Stress Oxidativo

O stress oxidativo (excesso de radicais livres) surge como consequência natural do metabolismo do oxigénio e ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a sua desintoxicação por remoção ou reparação dos danos por elas causados. O desequilíbrio pode advir duma diminuição das moléculas antioxidantes e/ou do aumento da produção das espécies reactivas, como resultado da exposição a condições ambientais oxidantes e/ou da produção aumentada sob condições patológicas. Normalmente, as células toleram stress oxidativo moderado regulando a síntese de antioxidantes através de alterações na expressão genética.⁵⁸

O metabolismo das drogas e toxinas pode formar outras espécies reactivas além das ROS e das RNS. O CCl_4 , por exemplo, metabolizado forma radicais livres altamente reactivos como o CCl_3^\cdot e $\text{CCl}_3\text{OO}^\cdot$.⁵⁹

Existem cada vez mais evidências de que o stress oxidativo (e as ROS/RNS) desempenha um papel crucial em vários passos que iniciam e regulam a progressão de várias doenças hepáticas.⁵⁹

Vários estudos sugerem o envolvimento do stress oxidativo nas lesões hepáticas induzidas pelo CCl_4 e os efeitos hepatoprotectores mediados por diferentes antioxidantes.^{52, 60}

O stress oxidativo, juntamente com a ligação covalente dos metabolitos reactivos, conduz à diminuição dos níveis celulares de glutathione, o que tem graves implicações na sobrevivência celular.⁵⁹

A glutathione é um tripéptido (γ -glutamyl-cisteina-glicina) que existe na forma tiol-reduzida (GSH) e dissulfido-oxidada (GSSG) e é sintetizada em todas as células do organismo mas, particularmente, no fígado. A GSH funciona como co-substrato nucleofílico para a glutathione transferase (GST) na desintoxicação de xenobióticos e como dador de electrões para a glutathione peroxidase na redução de hidroperóxidos. A GSH está também envolvida no transporte de aminoácidos, na manutenção do estado reduzido do grupo sulfidril das proteínas e no controlo de processos celulares como a transdução de sinais e a apoptose.^{59, 61} A peroxidação lipídica das mitocôndrias e a depleção da glutathione podem alterar a homeostase do cálcio e assim, induzir vários processos celulares que alteram as propriedades físico-

químicas das membranas celulares e diminuem as actividades enzimáticas membranares conduzindo, posteriormente, à morte celular.^{58, 59}

A catalase é outra enzima antioxidante, ubíqua, presente na maioria das células aeróbias. Está envolvida na remoção do H_2O_2 , produto tóxico do metabolismo do oxigénio, catalisando a sua conversão em oxigénio molecular e água.⁶¹

A quantidade de H_2O_2 surge elevada na urina de doentes com cancro. Estes valores também podem ser elevados aquando da ingestão de café. No entanto, os dados disponíveis são ainda insuficientes para se poder usar a medição de H_2O_2 na urina como indicador de stress oxidativo.⁶²

A catalase também apresenta actividade de peroxidação, onde alcóois de baixo peso molecular podem servir como dadores de electrões, produzindo água e formaldeído de baixo peso molecular. As duas actividades referidas permitem a quantificação espectrofotométrica da actividade da catalase.⁶¹

I.4.5.1. Defesas antioxidantes

Os antioxidantes protegem o fígado da toxicidade induzida pelo CCl_4 inibindo a peroxidação lipídica e aumentando a actividade das enzimas antioxidantes. Assim, um antioxidante ou inibidor da formação de radicais livres é importante para proteger o fígado das lesões induzidas pelo CCl_4 .⁵²

O sistema de defesa antioxidante pode incluir qualquer substância que neutralize o potencial destruidor das espécies reactivas. A dieta desempenha um papel vital, fornecendo antioxidantes nutritivos essenciais como a vitamina E (α -tocoferol), o β -caroteno, a vitamina C (ácido ascórbico) e os minerais essenciais, vitais co-factores dos antioxidantes enzimáticos (selénio), bem como compostos fenólicos vegetais como os flavonóides.^{59, 63}

Como o stress oxidativo desempenha um papel central nas doenças hepáticas, o uso de antioxidantes tem sido proposto como agente terapêutico. Contudo, a aquisição de tais compostos pela alimentação nem sempre será viável. Os extractos de plantas ou compostos naturais podem, facilmente, ser usados como alimentos e suplementos alimentares benéficos mas é difícil prever os efeitos da ingestão destes compostos em humanos, dado que as doses ou concentrações estudadas são inconsistentes com as observadas em humanos e não se distingue o antioxidante dos seus conjugados e metabolitos ou o sinergismo entre compostos. Assim, a aplicação bem sucedida dos antioxidantes vegetais como drogas requer um maior entendimento das suas propriedades.⁵⁹

I.5. Objectivos

Tendo em conta a ampla utilização de *C. intybus* na medicina tradicional, no tratamento de doenças hepáticas, o presente trabalho teve por objectivo estudar os possíveis efeitos protectores das cipselas (frutos) de *C. intybus*, em vários órgãos do ratinho (fígado, rim, baço, testículos e epidídimos), com ênfase no fígado, usando técnicas histopatológicas e bioquímicas. A escolha deste tema resultou de estudos prévios realizados pela autora desta dissertação e cujos resultados se mostraram promissores nesta matéria.

Capítulo II – MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo II – Material e Métodos

II.1. Preparação do Extracto Vegetal

Exemplares de *C. intybus* foram colhidos a 8 de Março de 2008 na berma da estrada N109, no distrito de Aveiro [coordenadas: 40°37'21,27"N; 8°39'04,95W (Google Earth®)]. Estes apresentavam-se secos, sendo apenas visíveis os caules e as inflorescências no estado de frutificação.

O extracto da referida planta foi preparado segundo o procedimento descrito por Madani *et al* (2008)²⁶. Os frutos (cipselas) foram submetidos a trituração num moinho de café. Posteriormente, preparou-se um macerado em álcool a 96% na concentração de 10 g/ml. Ao fim de 3 dias, o macerado foi decantado e filtrado com gaze. Este foi dividido por vários cadinhos e levado à estufa a 40 °C até à obtenção de um resíduo sólido. O extracto foi diluído em NaCl 0,9%, para a concentração pretendida.

II.2. Preparação de Soluções

De forma a estudar a toxicidade do extracto pelo método do teste Microtox foram preparadas as seguintes soluções:

- **5 mg/ml**
- **5 mg/ml de filtrado**
 - o Suspendeu-se o extracto em NaCl 0,9% e submeteu-se a solução obtida a filtração em vácuo com membrana de poro 0,45µm.
- **e 2,5 mg/ml de filtrado**
 - o Suspendeu-se o extracto em NaCl 0,9% e submeteu-se a solução obtida a filtração esterilizante, usando filtros de poro 0,2µm adaptados a seringa.

Para a realização dos estudos *in vivo*, foi preparada uma suspensão do extracto de cipselas (frutos) de *C. intybus* com a concentração de 25 mg/kg de ratinho. Esta foi sujeita a filtração esterilizante com filtros de poro 0,2µm adaptados a seringa.

II.3. Teste Microtox

A toxicidade aguda do extracto vegetal foi avaliada por um teste bacteriano, o teste Microtox®. A medição da bioluminescência requereu reagente do teste de toxicidade aguda Microtox®, *V. fischeri*, solução de reconstrução, diluente (NaCl 2%) e OAS (Osmotic Adjusting Solution, Cloreto de sódio 22%). O teste foi realizado por um analisador de toxicidade Microtox modelo 500. Este aparelho inclui uma câmara incubadora de temperatura controlada com 30 poços, regulada para 15°C e um pequeno compartimento, mantido a 5°C, designado por poço de reactivação, onde a suspensão de bactéria é colocada antes de se efectuar as diluições.

A avaliação de toxicidade dos extractos vegetais realizou-se aplicando o protocolo básico do teste. Este protocolo fornece uma curva dose/efeito que garante a reprodução e a fiabilidade do teste. A emissão de luz foi digitalmente gravada pelo software Microtox Omni Windows. O software calcula automaticamente a toxicidade em termos de percentagem de efeito em cada valor de concentração.

II.4. Animais, Tratamento e Sacrifício

Quarenta ratinhos (*Mus musculus* L.) ICR-CD1 machos adultos provenientes de Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) foram mantidos em gaiolas de polietileno no biotério do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro sob condições ambientais *standard*: 22±2°C de temperatura, fotoperíodo luz/escuridão de 12/12h e humidade relativa 40 – 60%. Os animais tiveram livre acesso a alimento e a água *ad libitum*. Foram mantidos durante pelo menos 2 semanas até se iniciar a experiência. Os animais foram pesados, agrupados (n=5) e administrados com várias soluções, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Esquema dos grupos usados e respectivo tratamento.

Grupo	Tratamento	Tempo de exposição
1	CCl ₄ [1,5 ml/kg]	dose única
2	CCl ₄ [1,0 ml/kg]	dose única
3	Controlo (NaCl 0,9%)	5 dias (5d)
4	Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]	5 dias (5d)
5	CCl ₄ [1,5 ml/kg] (1d) + <i>C. intybus</i> [25 mg/kg] (5d)	6 dias (6d)
6	<i>C. intybus</i> [25 mg/kg] (5d) + CCl ₄ [1,5 ml/kg] (1d)	6 dias (6d)
7	CCl ₄ [1,0 ml/kg] (1d) + <i>C. intybus</i> [25 mg/kg] (5d)	6 dias (6d)
8	<i>C. intybus</i> [25 mg/kg] (5d) + CCl ₄ [1,0 ml/kg] (1d)	6 dias (6d)

O NaCl (0,9%) foi usado como controlo negativo, sendo o CCl₄ (nas concentrações de 1 ml/kg e 1,5 ml/kg, usando azeite como veículo) usado como controlo positivo.

Efectuaram-se injeções subcutâneas na dose de 0,25 ml.

Os animais foram pesados numa balança (Precisa 220 M) antes de iniciar a exposição e diariamente até ao seu sacrifício. Após abate por deslocação cervical, ao fim de 24h de administrada a última injeção, procedeu-se à colheita do sangue de cada animal para posteriores análises clínicas, sem recurso a anticoagulante. Com vista à realização de estudos histológicos e de stress oxidativo, efectuou-se ainda a colheita de alguns órgãos (fígado, rins, baço, testículo e epidídimo) e determinação dos respectivos pesos, através de uma balança AND modelo HR-120. As amostras para estudos de stress oxidativo foram congeladas a -80°C.

II.5. Estudos Histológicos

Parte dos fragmentos dos órgãos acima mencionados foram imersos em fixador de Bouin e os restantes fixados com formalaldeído tamponado a 4% para estudos histológicos. Após a fixação, procedeu-se à desidratação numa série crescente de etanol, à qual se seguiu a impregnação e a inclusão em parafina (grau de fusão 56-58°C). Foram efectuados cortes histológicos com a espessura de 2-5 µm, no micrótopo (Leitz 1512). Após secagem na estufa, procedeu-se à desparafinação e

rehidratação. Foram realizadas duas técnicas de coloração: hematoxilina-eosina e Tricrómio de Masson. Efectuou-se nova desidratação e clareamento com xilol. As preparações foram montadas em meio Eukitt® (*Vidrolab*) e observadas ao microscópio óptico Olympus modelo BX41TF, com sistema fotográfico acoplado. Mediu-se o diâmetro dos túbulos seminíferos nas preparações histológicas do testículo, em todos os grupos. Para o efeito foram tiradas 10 fotografias, na ampliação de 100x, de diferentes secções de testículo por grupo. Analisou-se o diâmetro de 50 túbulos, por tratamento, no programa SNAKES⁶⁴.

II.6. Estudos Hematológicos

Efectuaram-se esfregaços sanguíneos corados pelo método de Wright. Estes foram observados no microscópio óptico acima referido. O procedimento foi repetido para os grupos 2-4 e 7-8 (Tabela 1).

As análises das transaminases AST e ALT, Alb e TP foram efectuadas no Centro de Análises AVELAB, em Aveiro, a partir das restantes amostras de sangue. Estas foram centrifugadas numa centrífuga Hettich Zentrifugen Rotina 38 a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante foi colhido para uma cuvete e as referidas análises foram efectuadas num aparelho Olympus AU2700. Os dados da AST e da ALT foram expressos em U/l e os da Alb e TP em g/dl.

II.7. Stress Oxidativo

No presente trabalho determinou-se a actividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e Glutathione-S-Transferase (GST) em amostras de rim e de fígado de todos os grupos de animais.

Após descongelação, o rim e cerca de 1/3 do fígado armazenado foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador (Yellow line) num volume de 1ml de tampão fosfato (50 mM, pH=7,0) com Triton-X-100 0,1% [NaH₂PO₄ 65 mM com 250 µl de Triton X-100; Na₂HPO₄ 50 mM com 500 µl de Triton X-100; proporção aproximada de 1:1,5 (v/v), pH = 7,0]. De seguida, procedeu-se à centrifugação dos homogeneizados num centrífuga Hettich Zentrifugen Miko 22R a 12700 r.p.m.,

durante 10 minutos a 4°C. O resultante foi congelado a -80°C para posterior uso nos ensaios pretendidos.

II.7.1. Determinação da actividade da Catalase

No presente trabalho, seguiu-se o método descrito por Aebi (1984)⁶⁵, determinando-se a actividade da CAT pela decomposição do H₂O₂ a 240nm, sendo a sua velocidade de degradação proporcional à quantidade de enzima presente.

Após descongelamento das amostras homogeneizadas e posteriormente diluídas, efectuou-se a análise cinética num espectrofotómetro (Jenway; 6505 UV/Vis. Spectrophotometer) em função cinética, para a absorção no comprimento de onda de 240 nm, com leituras de 1 em 1 segundos, durante 30 segundos. A reacção foi iniciada com H₂O₂ a 30mM. O procedimento foi efectuado numa cuvete de quartzo (volume 1,0 ml). Após a mistura reaccional, registou-se a diminuição da absorvância a 240 nm durante 30 segundos. Foram realizadas quatro réplicas.

Por fim, procedeu-se à quantificação da proteína total presente nas diluições analisadas pelo método de Bradford (II.7.3).

Os dados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

II.7.2. Quantificação da glutathiona S-transferase

As GST catalisam a reacção de conjugação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH (glutathiona tiol-reduzida), formando-se tioéter dinitrofenilo, que pode ser monitorizado espectrofotometricamente pelo aumento da absorvância a 340nm.⁶⁶

Após o descongelamento das amostras homogeneizadas e diluídas, efectuou-se o preenchimento das micro-placas (96 well WIA/RIA plate, 3590) com as várias amostras dos diferentes grupos. Efectuaram-se quatro réplicas por amostra. A solução de reacção foi feita no momento do preenchimento, sendo a última a ser adicionada aos poços, com o auxílio de uma micropipeta multicanais (High Tech, MT300). O registo do aumento da absorvância foi efectuado no leitor de microplacas (LabSystems; Multiskan Ex) previamente programado para função cinética em comprimento de onda de 340nm e com leituras de 10 em 10 segundos durante 5 minutos (leitura contínua).

Os resultados foram apresentados em nmole de conjugado (tioéter)/minuto/miligrama de proteína (coeficiente de extinção molar usado: $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). As mesmas diluições foram submetidas a quantificação final da proteína pelo método de Bradford (descrito em II.7.3).

II.7.3. Doseamento de proteínas

A quantificação da proteína total é importante para normalizar a quantidade de outros metabolitos e actividades enzimáticas da amostra por miligrama de proteína. Neste trabalho foi usado o método de Bradford para quantificação da proteína. O princípio deste método envolve a ligação de um corante ácido de Coomassie Blue G-250 (reagente de Bradford) à proteína total em solução, dando origem a um complexo corado e estável passível de ser quantificado espectrofotometricamente a 595nm. A absorção a 595nm é proporcional à quantidade de proteína presente. Na microplaca (96 well WIA/RIA plate, 3590), prepararam-se soluções padrão da proteína γ -globulina bovina (0,2; 0,5; 1 mg/ml) tendo-se efectuado quatro réplicas de cada. Os restantes poços da placa foram preenchidos com 10 μl da respectiva amostra (quatro réplicas). Seguidamente adicionou-se 250 μl de reagente de Bradford. Após agitação durante 15 minutos, efectuou-se a leitura das absorvâncias a 595 nm num leitor de micro-placas (Labsystems; Multiskan Ex). O preenchimento da micro-placa foi idêntico para todas as amostras/grupos.

II.8. Análise Estatística

Foi usado o software SIGMASTAT 3.5 (Systat Software Inc., CA, EUA) na análise dos dados obtidos e realizados testes de ANOVA unifactorial para avaliar as diferenças entre os vários grupos. Se se observar significância entre os grupos, é usado o teste Student-Newman-Keuls para comparar as médias de dois grupos específicos. Na impossibilidade de efectuar o referido teste (eg. ensaios enzimáticos - III.6) é realizada uma ANOVA on Ranks e, caso se verifique significância entre os grupos, é usado o teste de Dunnett. Os dados estão expressos como média \pm desvio-padrão. Resultados com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Capítulo III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo III – Resultados e Discussão

Os possíveis efeitos protectores das cipselas (frutos) de *C. intybus* foram estudados contra a toxicidade induzida por CCl_4 . Os radicais livres produzidos pelo CCl_4 afectam a permeabilidade celular dos hepatócitos, levando ao aumento dos níveis dos parâmetros bioquímicos séricos como as ALT e AST, o que provoca alterações histopatológicas como necrose, congestionamento dos vasos, alterações lípidicas, desintegração nuclear, hiperplasia das células de Kupffer, entre outras.² O inverso pode ser considerado como um índice de actividade hepatoprotectora.⁶⁷

Os estudos apresentados neste trabalho procuraram compreender os efeitos do extracto, histológica e enzimaticamente.

III.1. Efeitos do extracto em *Vibrio fischeri*

Os valores de toxicidade obtidos pelo Microtox após 5 e 15 minutos de exposição foram expressos em EC_{50} , valor para o qual o efeito tóxico sobre a luciferase da bactéria resultou na emissão de menos 50% de bioluminiscência. Os EC_{50} aos 5 e aos 15 minutos não foram significativamente diferentes, logo são apenas mencionados os EC_{50} aos 5 minutos.

A primeira amostra (5 mg de extracto/ml NaCl 0,9%, sem filtração posterior) resultou num EC_{50} de 450 mg/kg. A existência de partículas em suspensão poderá estar na origem das irregularidades da curva apresentada na Figura 6. Verificou-se, também, um elevado potencial tóxico pela perda contínua de bioluminiscência até apresentar, praticamente, 100% de efeito tóxico.

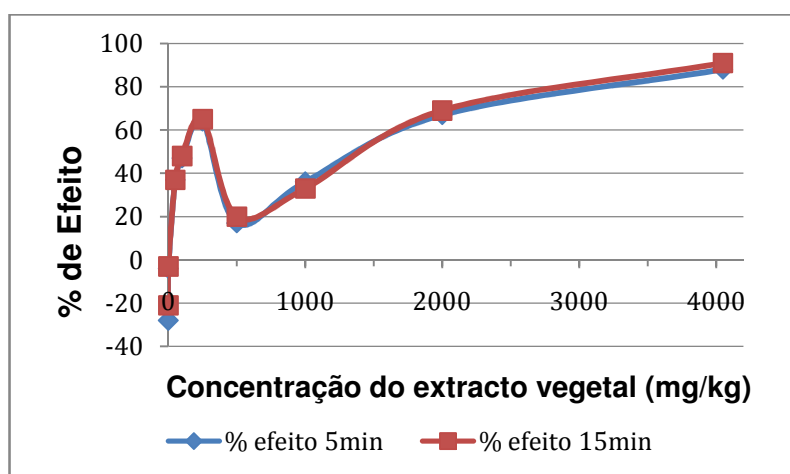


Figura 6 - Curva efeito/concentração obtida no teste Microtox com extracto de cipselas de *C. intybus* (sem filtração após extracção).

A amostra de concentração idêntica sujeita a filtração em vácuo com membrana de poro 0,45µm apresentou uma curva de efeito mais regular (Figura 7) e EC₅₀ de 2100 mg/kg, atingindo de seguida um “plateau”. Verificou-se que, apesar da referida filtração, os compostos nocivos permaneceram no extracto.

A amostra de concentração inicial 2,5 mg/ml, sujeita a filtração com seringa com filtro estéril acoplado de 0,2µm de poro, resultou numa curva regular - Figura 7, direita – e um EC₅₀ estimado de 375 mg/kg.

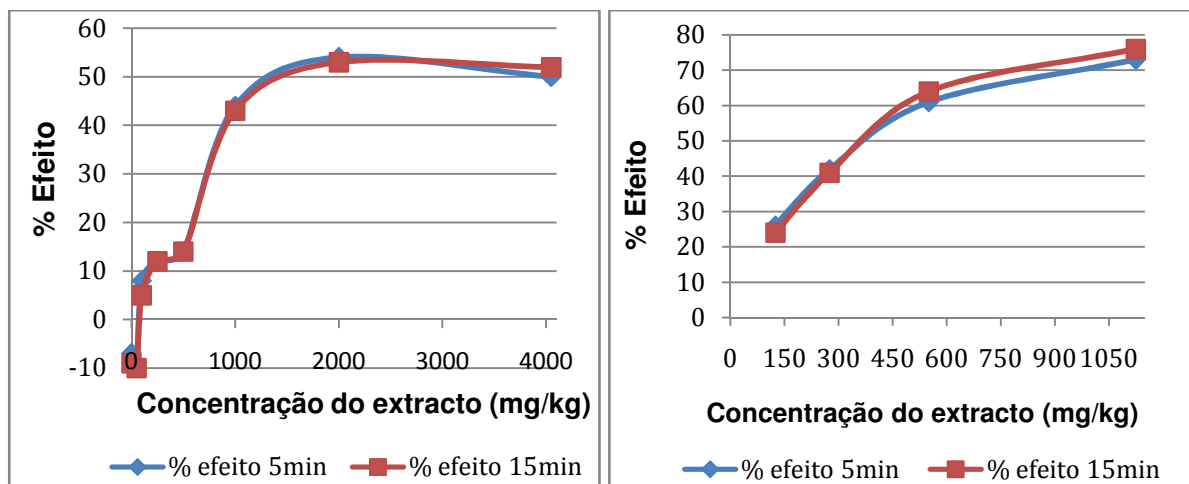


Figura 7 – Curva efeito/concentração obtida no teste Microtox com extractos de cipselas de *C. intybus* (esquerda: filtrado com poro de 0,45µm de diâmetro; direita: filtrado com poro de 0,2µm de diâmetro)

O Microtox mostrou ser um método muito sensível, rápido, fácil de executar, com vista à avaliação de toxicidade aguda e crónica de extractos vegetais, tal como sugerido por Conforti *et al* (2008)³¹. Os extractos estudados no presente trabalho apresentaram valores de toxicidade consideráveis. Estes resultados poderão ser justificados pelo facto de se tratar duma planta espontânea cuja composição pode variar dentro da mesma espécie e de região para região. A toxicidade registada sugere ainda dependência da filtração executada, tendo-se obtido valores menores de toxicidade e intervalos de confiança mais fiáveis no extracto filtrado com poro de menor dimensão (i.e. 0,2µm). Reafirma-se, assim, tal como o publicado por Proença da Cunha *et al* (2006)¹, a importância na qualidade das matérias-primas vegetais que envolvem aspectos macroscópicos, microscópicos, pesquisa de impurezas e de falsificações, análise de compostos activos e controlo dos vários contaminantes.

Segundo os resultados do Microtox, a concentração de 25 mg/kg não mostrou efeitos nocivos em qualquer das 3 soluções testadas, razão pela qual foi utilizada nos estudos *in vivo*.

III.2. Sobrevivência e comportamento

No presente trabalho observou-se uma taxa de sobrevivência dos animais em estudo de 20% no grupo 7 e de 100% nos restantes. A mortalidade obtida registou-se a menos de 24h após a administração do tóxico. Não se notaram quaisquer alterações no consumo de alimento e de água, excepto nos grupos aos quais foi administrado o CCl₄.

Não se observaram alterações significativas no comportamento ou aspecto dos ratinhos dos grupos 3 e 4. Os ratinhos dos controlos positivos, apresentavam pouca actividade, fraca reacção à manipulação e pelagem mais rarefeita e espessa ao fim de 24h. Nos grupos 5-8 observaram-se idênticas alterações, apenas algumas horas após a administração do tóxico. Nos grupos 5 e 7 observou-se recuperação lenta da actividade e da pelagem após a administração do extracto vegetal.

III.3. Evolução do peso corporal e rácios

A evolução dos pesos corporais, parâmetro de diagnóstico complementar, é apresentada na Figura 8.

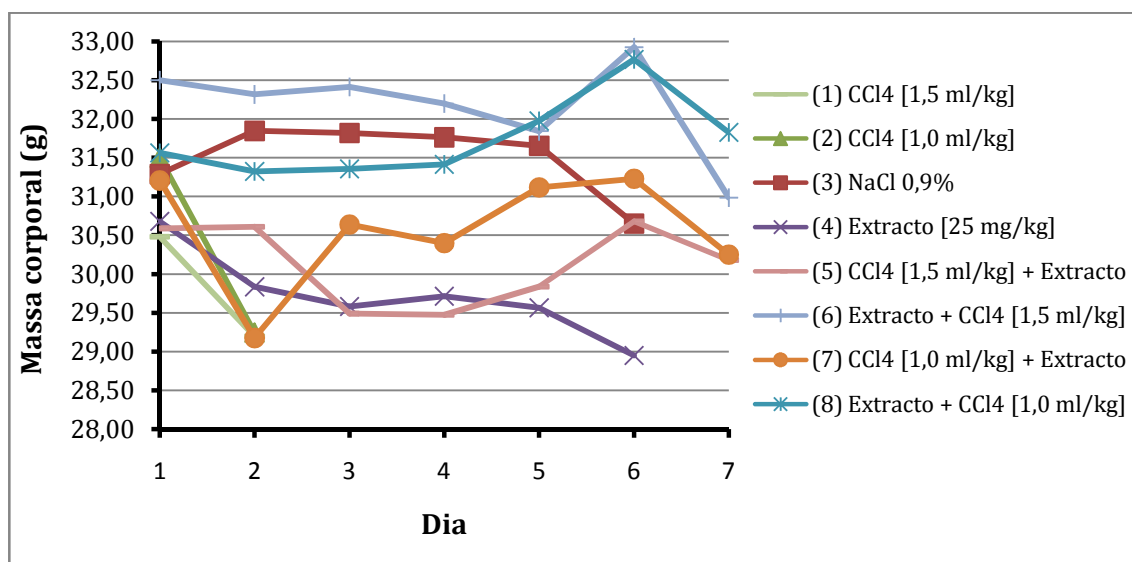


Figura 8 - Evolução da massa corporal dos ratinhos dos diferentes grupos (g), ao longo do trabalho experimental.

Os ratinhos sujeitos ao CCl₄ apresentaram quebra acentuada da massa corporal. Os animais administrados com o extracto vegetal também apresentaram perda de massa, o que está em desacordo com as observações efectuadas por Schmidt *et al*

(2007)³⁶, em ratos. Tal poderá estar relacionado com o facto de se tratar de uma planta espontânea, cuja composição está sujeita a diversos factores ambientais. Desta forma, algum dos constituintes químicos do extracto poderá induzir a perda de peso e/ou apetite. Tais efeitos, também poderão resultar de diferentes proporções entre os constituintes químicos do extracto e da existência de sinergismos entre os mesmos e posterior reacção no ambiente celular. No entanto, nos grupos de tratamento 5 e 7 observou-se um aumento da massa corporal após o 2º e 3º dia de iniciada a experiência. Logo, o extracto terá desencadeado uma resposta nos animais que levou à recuperação de peso.

A análise dos rácios de massa órgão/ratinho permitiu identificar diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos, para $p \leq 0,05$. A Tabela 2 apresenta os valores de rácio massa órgão/massa corporal (em percentagem) dos animais dos vários grupos, bem como os resultados do teste estatístico.

Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos no rácio dos órgãos dos animais dos vários grupos.

Grupos	Fígado	Rim	Baço	Testículo	Epidídimo
1	6,4253±0,8321	1,2614±0,1593 ^c	0,2244±0,0608 ^b	0,3215±0,0621	0,1074±0,0246
2	4,7688±0,1745 ^{a,b}	1,0830±0,1449 ^{b,c}	0,2324±0,0329 ^b	0,3152±0,0275	0,1323±0,0126
3	4,6886±0,3076 ^{a,b}	0,9121±0,0598 ^{a,c}	0,2690±0,0316	0,3486±0,0337	0,1332±0,0116
4	4,5324±0,2482 ^{a,b}	0,9137±0,1023 ^{a,c}	0,2796±0,0221	0,3684±0,0532	0,1512±0,0119 ^a
5	5,5235±0,4423 ^a	0,7845±0,0486 ^{a,c}	0,3296±0,0494	0,3632±0,0301	0,1232±0,0148
6	4,9356±0,3116 ^{a,b}	0,8467±0,1444	0,3011±0,0498	0,3240±0,0386	0,1197±0,0190
7	5,1092 ± Indf.	0,9888 ± Indf	0,3292 ± Indf	0,3567 ± Indf	0,1588 ± Indf
8	4,8562±0,3713 ^{a,b}	1,0600±0,2132 ^{b,c}	0,2248±0,0292 ^b	0,3083±0,0717	0,1305±0,0265

Os valores correspondem a média ± desvio-padrão com n=5. Grupo (7) com n=1.

a) Significativamente diferente do grupo 1 ($p \leq 0,05$).

b) Significativamente diferente do grupo 5 ($p \leq 0,05$).

c) Significativamente diferente do grupo 6 ($p \leq 0,05$).

Observaram-se diferenças consideráveis de rácio entre todos os grupos de animais, sobretudo no fígado e no rim. Devido à baixa taxa de sobrevivência do grupo 7, este foi excluído dos testes estatísticos.

O testículo e o epidídimo foram os menos afectados em termos de rácio. Apenas o epidídimo do grupo 4 (apenas extracto) apresentou um aumento de massa

significativo e consequentemente um aumento do rácio, distinguindo-se estatisticamente do grupo 1. Tal sugere que o extracto terá levado à ocorrência de efeitos mensuráveis no epidídimo. Estes resultados e os registados por Shmidt *et al* (2007)³⁶ sugerem que o extracto terá o potencial de afectar o metabolismo e inclusive o sistema endócrino, conduzindo a alterações a nível do rácio dos órgãos do sistema reprodutor, como o epidídimo. Estas alterações poderão estar relacionadas com reacções bioquímicas entre os compostos do extracto vegetal e as hormonas animais. Os compostos em questão deverão consistir de lactonas de sesquiterpenos, uma vez que o extracto usado pelo referido autor, extraído da raiz de *C. intybus*, era rico nestes compostos.

O grupo 1 apresentou um rácio inferior ao do grupo de controlo negativo, o que se deverá aos efeitos nocivos dos radicais livres gerados pelo metabolismo do CCl₄, que afectarão também a barreira hemato-testicular.

Em relação ao fígado, todos os grupos analisados apresentaram um rácio significativamente inferior ao observado no grupo 1, inclusivamente o grupo 2. Uma vez que CCl₄ foi administrado em maior dose no grupo 1 do que no grupo 2, a diferença de concentrações usadas é óbvia nesta análise dos rácios, o que indica a utilidade desta análise complementar.

Da mesma forma, a aproximação dos valores de rácio dos tratamentos ao do grupo de controlo negativo poderá sugerir a recuperação e/ou protecção do fígado pelo extracto.

Relativamente aos grupos de tratamento, os valores do rácio hepático sugerem a possibilidade de recuperação considerável dos danos induzidos pelo tóxico no grupo 6, distinguindo-se este, estatisticamente, do grupo 1 (o seu respectivo grupo de controlo positivo) e do grupo 5 (que recebeu tratamento idêntico mas na ordem inversa). O grupo 5, contudo, apesar de significativamente diferente do grupo 1, apresentou valores de rácio hepático que se distinguem significativamente dos grupos 3 e 4 (controlo negativo e extracto, respectivamente). Logo, tal poderá indicar que o efeito do extracto no fígado dos animais não foi suficiente para uma recuperação clara das lesões induzidas pelo tóxico, na duração do ensaio. Tal análise sugere que aumentando a duração do ensaio, i.e. do tratamento com o extracto vegetal, se poderia observar uma maior recuperação do tecido hepático. Poder-se-á considerar a mesma análise para o grupo 8.

Os grupos 3 e 4 apresentaram valores idênticos de rácio renal. Logo, estes resultados indicam que o extracto não deverá ter efeitos nefastos no rim. Os

controles positivos, diferentemente do que sucede no fígado, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Os grupos 1 e 2 apresentaram rácios diferentes dos grupos 3 e 4. Logo, esta análise revelou claramente como o CCl_4 tem efeitos nocivos no rim, que resultaram em rácios que se distinguem significativamente dos grupos de controlo e com o extracto, respectivamente.

No caso do grupo 8, o extracto vegetal não resultou numa protecção óbvia do tecido renal, uma vez que este grupo não apresentou valores de rácio renal significativamente diferentes do seu respectivo controlo positivo (grupo 2).

Os grupos 5 e 6, submetidos a uma dose de CCl_4 superior à usada nos grupos 7 e 8, apresentaram não só uma diminuição acentuada do rácio renal relativamente ao respectivo controlo positivo, mas também relativamente ao controlo negativo e com o extracto. Tal sugere que os compostos presentes no extracto terão reagido com o CCl_4 , tendo como consequência a diminuição da massa renal.

O CCl_4 provocou também a diminuição do rácio esplénico. Contudo, ao contrário do verificado no rim, surgiram valores mais elevados nos grupos 5 e 6. Tal resultado sugere que no caso do baço e aquando da exposição ao tóxico de maior dose (cujo controlo positivo foi o grupo 1), a reacção do extracto vegetal com o tóxico levou a um aumento da massa esplénica.

Verificou-se, assim, que o extracto vegetal teve uma acção diferente nos órgãos em estudo, quer quando administrado *per si*, quer com o CCl_4 . É importante realçar que a análise até aqui efectuada, apesar de complementar e com várias limitações, sugere a necessidade de novos ensaios (inclusivamente, *in vitro*) para tentar compreender como os compostos presentes no extracto vegetal se manifestam de forma diferente. As reacções bioquímicas envolvidas também poderão depender da quantidade de radicais originados pelo metabolismo do CCl_4 .

III.4. Aspecto macroscópico dos órgãos

A observação macroscópica do fígado de animais dos grupos 1 e 2 revelou severas alterações, incluindo hemorragias e descolorações evidentes, perdas de textura e de consistência. O lóbulo direito foi a parte mais afectada. O rim e o baço mostraram hipertrofia. Os grupos de tratamento 5-8 apresentaram alterações hepáticas idênticas mas, em menor incidência e rins e baço normais. O grupo de controlo negativo (3) revelou um padrão normal.

III.5. Estudos Hematológicos

III.5.1. Análises do soro sanguíneo

Os resultados obtidos das actividades das transaminases (ou aminotransferases) séricas foram registados na Tabela 3.

Tabela 3- Efeitos do extracto de cipselas de chicória nas actividades das transaminases séricas sanguíneas.

	Ratinho				
	1	2	3	4	5
(1) CCl₄ [1,5 mg/kg]					
AST ou GOT (U/l)	5787	6804	-	393	20
ALT ou GPT (U/l)	6610	3169	-	7885	6517
(2) CCl₄ [1,0 mg/kg]					
AST ou GOT (U/l)	7254	(-13)	(-10)	-	(-4)
ALT ou GPT (U/l)	2637	11	12	-	12
(3) NaCl 0,9%					
AST ou GOT (U/l)	7817	3910	4309	1008	1321
ALT ou GPT (U/l)	4335	523	451	2476	5838
(4) Extracto de cipselas de <i>C. intybus</i> [25 mg/kg]					
AST ou GOT (U/l)	2901	5149	7550	7104	7886
ALT ou GPT (U/l)	840	641	6986	1080	1560
(5) CCl₄ [1,5 mg/kg] (1d) + <i>C. intybus</i> [25 mg/kg] (5d)					
AST ou GOT (U/l)	72	2497	317	549	339
ALT ou GPT (U/l)	6479	-	3343	5417	4019
(6) <i>C. intybus</i> [25 mg/kg] (5d) + CCl₄ [1,5 mg/kg] (1d)					
AST ou GOT (U/l)	-	15	13	25	-
ALT ou GPT (U/l)	-	-	-	6956	-
(7) CCl₄ [1,0 mg/kg] (1d) + <i>C. intybus</i> [25 mg/kg] (5d)					
AST ou GOT (U/l)	-	-	-	8225	-
ALT ou GPT (U/l)	-	-	-	4439	-
(8) <i>C. intybus</i> [25 mg/kg] (5d) + CCl₄ [1,0 mg/kg] (1d)					
AST ou GOT (U/l)	(-12)	2089	7229	(-2)	(-13)
ALT ou GPT (U/l)	8	7	1999	20	11

As actividades das aminotransferases AST e ALT registadas no soro não permitiram a sua análise estatística devido às diferenças evidentes observadas. Contudo, a

nível da AST, foi visível a diferença entre o grupo 3 e 4, tendo apresentado este último, valores superiores de actividade desta enzima, uma tendência também observada em ratos, por vários autores^{14,15,26,35}. Estes, também observaram valores elevados de actividade da ALT e da AST nos animais a que foi administrado CCl₄. No entanto, a bibliografia não esclareceu a grande variabilidade dos valores obtidos.

Também foram efectuadas análises no soro sanguíneo dos animais dos vários grupos a dois indicadores de regeneração hepática⁵⁷, nomeadamente à Alb e à TP (Figura 9).

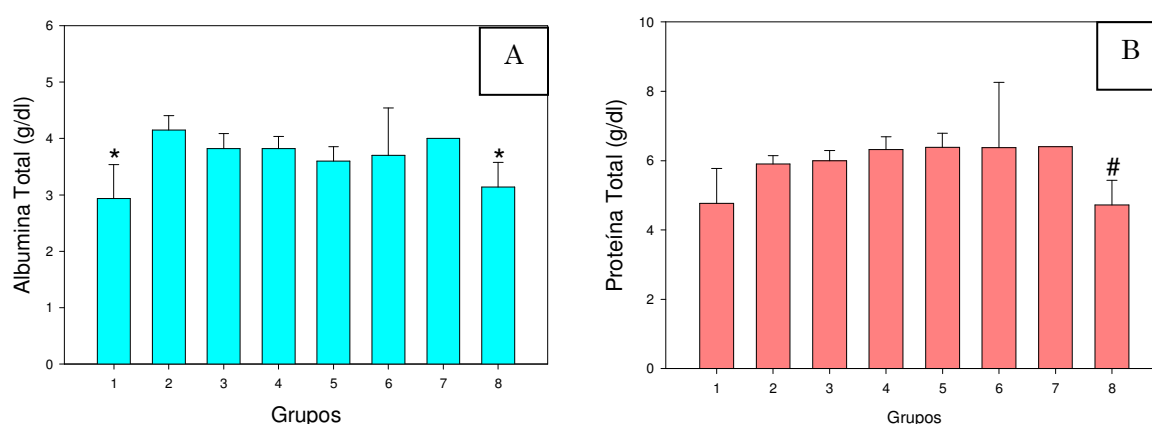


Figura 9- Efeitos do extracto de cipselas de *C. intybus* em toxicidade induzida por CCl₄, nas actividades da Alb e da TP. (A) Alb. (B) TP. Valores expressos em termos de média \pm desvio-padrão. Grupos: de acordo com a Tabela 1.

*** Significativamente diferente do grupo 2 ($p \leq 0.05$).**

Significativamente diferente do grupo 5 ($p \leq 0.05$).

Alterações nos hepatócitos resultam numa síntese deficiente de albumina e portanto, na diminuição da sua concentração na corrente sanguínea. Assim, como seria de esperar, o grupo 1 apresentou valores plasmáticos de Alb inferiores aos dos grupos 3 e 4. Contudo, o grupo 2 apresentou valores de Alb superiores ao controlo negativo e extracto, contrariamente ao observado por Sadeghi *et al* (2008)³⁵. No entanto, está no seguimento das diferenças observadas no capítulo III.3. O grupo 5 apresentou valores de Alb próximos do controlo negativo, indicando a potencial recuperação do fígado por acção do extracto vegetal.

O grupo 8 apresentou diferença significativa relativamente ao respectivo grupo de controlo positivo, o grupo 2. Por outro lado, o grupo 8 apresentou valores de Alb inferiores aos dos verificados nos grupos 3 e 4, o que sugere a ocorrência de graves lesões hepáticas.

Os valores da TP no grupo 1 foram inferiores aos do grupo 3, tal como verificado por Ahmed *et al* (2003)¹⁵.

A análise da TP registada nos vários grupos não permitiu deduzir sobre a capacidade de protecção e/ou de regeneração do extracto vegetal.

A análise da Alb e da TP indicou que o extracto vegetal *per si* não induzirá lesões hepáticas.

III.5.2. Esfregaço Sanguíneo

Para tentar identificar alterações ao nível da estrutura e número das células sanguíneas, foram realizados esfregaços de sangue dos animais dos grupos 2-4 e 7-8 (Tabela 1). A Figura 10 apresenta imagens das observações realizadas.

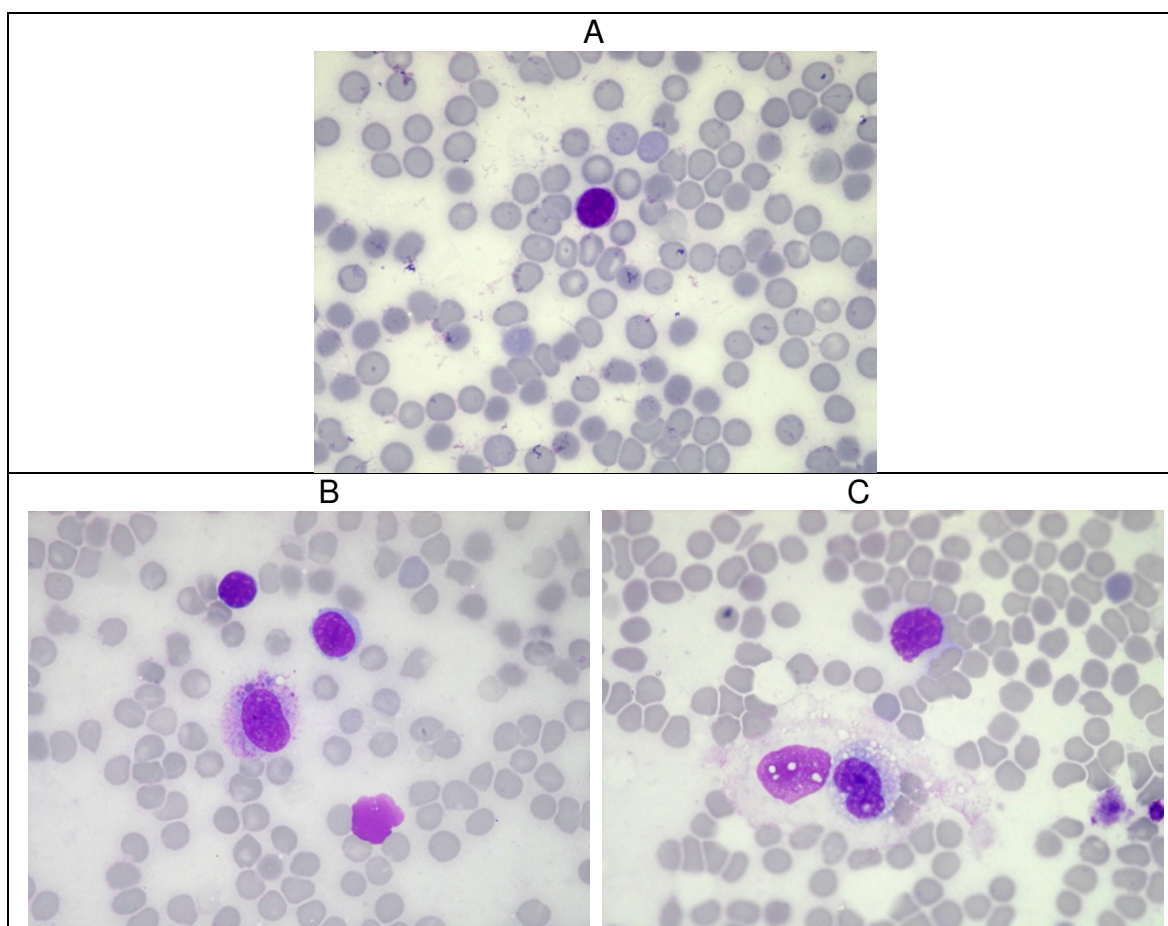


Figura 10- Efeitos do extracto de cipselas de chicória em toxicidade induzida por CCl_4 , no esfregaço sanguíneo. (A) NaCl. (B e C) CCl_4 1,0 ml/kg. $A_t = 1000x$.

Nos animais do grupo de controlo negativo (A) não se observaram alterações no esfregaço. No controlo positivo (B) foi registado algum polimorfismo nos glóbulos brancos. Nos grupos 4, 7 e 8 não se observaram alterações significativas.

III.6. Stress oxidativo

A overdose de toxinas e de algumas drogas e o seu uso prolongado podem produzir elevados teores de radicais livres que provocam stress oxidativo e danos no fígado.⁶⁸ Estes podem danificar ácidos nucleicos, lípidos e proteínas, sendo que apenas as lesões que bloqueiem a replicação do DNA e/ou que destruam a integridade da membrana celular podem ser letais. Para reduzir estes efeitos, as células utilizam uma série de defesas antioxidantes, como a glutathione e a catalase, que removem/inactivam as espécies reactivas de oxigénio.⁵⁸

Os efeitos tóxicos de um xenobiótico podem ser modificados por antioxidantes e por antiprooxidantes presentes nas células vegetais, ao se ligarem às espécies reactivas de oxigénio.^{69, 70}

III.6.1. Catalase (CAT)

Autores como Nayeemunnisa e Rani (2003)²⁸ reconhecem que a actividade desta enzima surge diminuída quando ocorre activação da peroxidação lipídica. No presente trabalho, não foi possível determinar a sua actividade nos grupos de controlo positivo, provavelmente devido à gravidade das lesões provocadas pelo CCl₄ nos dois órgãos.

A tendência desta enzima é idêntica no fígado e no rim, apesar da maior actividade metabólica e de desintoxicação no primeiro (atente-se a maior escala de A em relação a B, na Figura 11). Tal como sucedeu na análise estatística dos rácios, não foi considerado o grupo 5, pela ausência de réplicas.

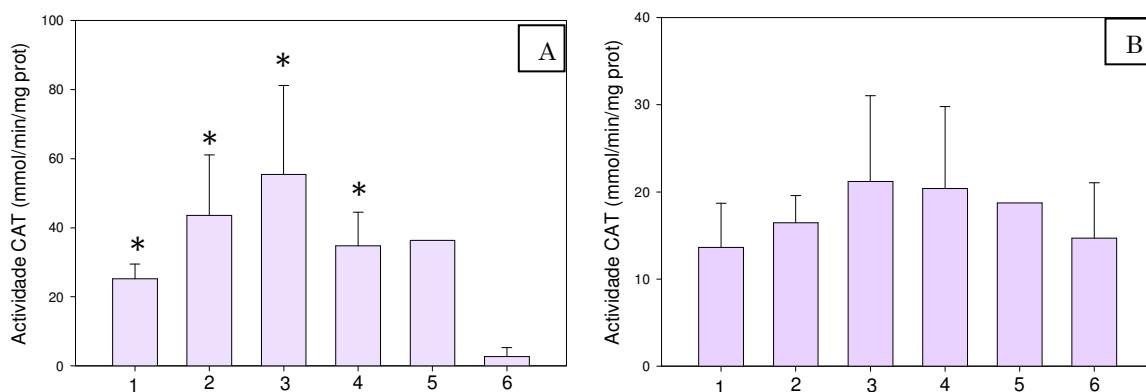


Figura 11 - Tendência observada para a actividade da CAT nos diferentes grupos. Valores representados em termos de média \pm desvio-padrão. (A) Fígado; (B) Rim. Grupos: (1) NaCl 0,9%; (2) Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (3) CCl₄ [1,5 ml/kg] + Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (4) Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg] + CCl₄ [1,5 ml/kg]; (5) CCl₄ [1,0 ml/kg] + Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (6) Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg] + CCl₄ [1,0 ml/kg].

* Significativamente diferente do grupo 6 ($p \leq 0.05$).

Tanto no fígado (A) como no rim (B), o grupo de controlo negativo apresentou a menor actividade da CAT, sendo esta considerada como a actividade basal e normal da CAT.

A actividade da CAT no fígado dos animais do grupo 6 distinguiu-se significativamente da observada nos restantes grupos 1-4.

Este grupo (grupo 6) foi o que apresentou menor actividade da CAT, possivelmente devido aos elevados danos nos tecidos hepáticos. No caso deste grupo, o extracto vegetal poderá ter potenciado os efeitos do tóxico a ponto das próprias enzimas serem destruídas e/ou deixar de ocorrer a sua formação (inactivação da transdução do gene que codifica esta enzima e/ou danificação da própria cadeia de DNA). Contudo, os resultados para este grupo no rim não permitem a mesma análise. No rim, não se observaram diferenças significativas entre os vários grupos. A actividade da CAT registada no grupo 6 (Figura 11 B) aproximou-se da actividade registada nos grupos 1 e 2 (controlo negativo e extracto). Tal resultado poderá indicar a existência dum efeito protector do rim pelo extracto vegetal.

O extracto *per si* apresentou o potencial de aumentar a actividade da CAT (grupo 2 - Figura 11). A actividade desta enzima surgiu aumentada, também, nos fígados dos animais do grupo 3 (grupo 5 da Tabela 1) e também do grupo 4, no caso do rim. Este resultado poderá indicar um combate activo aos radicais livres e consequentes lesões originadas pelo CCl₄.

Os resultados obtidos sugerem o combate aos efeitos tóxicos do CCl₄, tanto no fígado como no rim, pelo aumento da actividade da CAT. No entanto, o pequeno

tamanho dos grupos estudados e a heterogeneidade de resultados não permitem concluir objectivamente sobre o efeito do extracto vegetal no estado oxidativo dos órgãos estudados.

III.6.2. Glutathione-S-transferase (GST)

A GST representa um dos principais grupos de enzimas de desintoxicação. O nível de expressão da GST é essencial para determinar a sensibilidade das células a diversas substâncias tóxicas. A maioria dos tecidos tumorais humanos expressa quantidades significativas desta enzima.⁷¹

Pode-se verificar na Figura 12 que a actividade da GST foi, também, bastante mais expressiva no fígado do que no rim uma vez que o fígado é o principal órgão de desintoxicação.

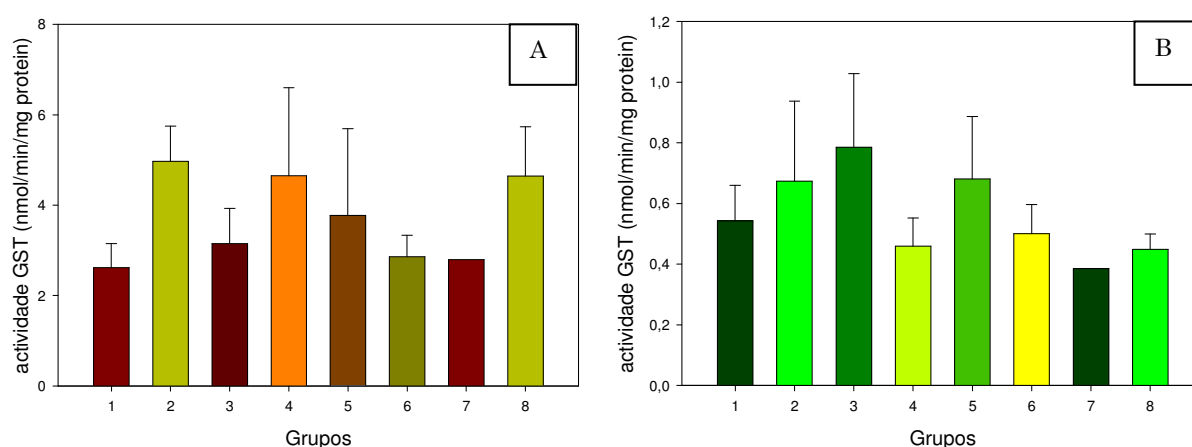


Figura 12 - Tendência observada para a actividade da glutathione-S-transferase (GST) nos diferentes grupos. Valores representados em termos de média \pm desvio-padrão. (A) Fígado; (B) Rim. Grupos: de acordo com a Tabela 1.

As diferenças entre as médias dos vários grupos não permitiram excluir a possibilidade de que estas se devam à variabilidade aleatória dos indivíduos, pelo que estatisticamente não se verificam diferenças significativas na actividade da GST quer no fígado, quer no rim.

No entanto, é de registar, novamente o caso peculiar do grupo 2 – a actividade da GST neste grupo revelou ser superior à observada para o grupo de controlo negativo (grupo 3) no fígado e inferior mas muito próxima no rim.

Com base nos resultados registados na Figura 12, o extracto apresentou o potencial de aumentar a actividade da GST no fígado e de diminuir a actividade desta enzima no rim.

No entanto, a heterogeneidade dos resultados obtidos para a actividade da GST e o tamanho reduzido dos grupos não permitem concluir se o extracto vegetal terá efeitos regeneradores e/ou protectores no fígado e no rim.

Foi possível, contudo, verificar a variabilidade de respostas que o extracto vegetal poderá induzir no organismo consoante as situações em que é administrado: *per si*, antes ou depois do CCl₄, dependendo da dose administrada deste tóxico e do órgão em estudo. Esta observação está de acordo com o já anteriormente verificado em III.3, por exemplo.

Os resultados obtidos justificam o alargamento dos estudos de toxicidade dos extractos vegetais a vários órgãos.

III.7. Observação histopatológica

III.7.1. Fígado

A eficácia de qualquer composto hepatoprotector depende, essencialmente, da sua capacidade em reduzir os efeitos nocivos induzidos por determinado agente ou de manter a fisiologia hepática.³⁹ Nestas situações observa-se uma intensa actividade regenerativa, incluindo mitoses e células bi- ou trinucleadas. Os núcleos dos hepatócitos são volumosos, com nucléolos evidentes, indicando elevada síntese proteica.⁴²

A Figura 13 apresenta os resultados da análise histológica do parênquima hepático.

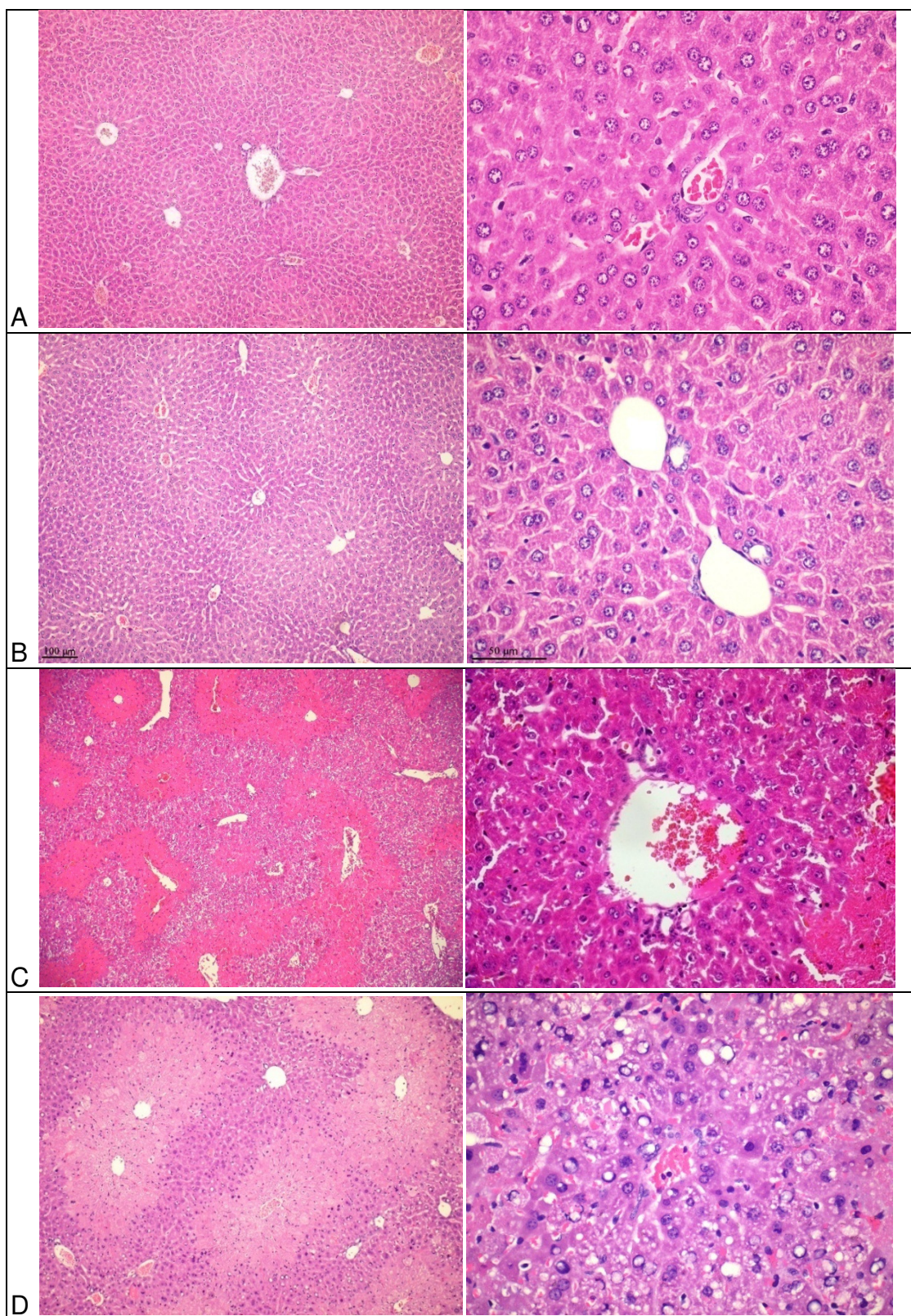


Figura 13 - Efeito dos compostos a seguir indicados na histologia hepática (HE, 100x e 400x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (C) CCl₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl₄ [1,0 ml/kg].

Não se observaram alterações histopatológicas relevantes nos grupos 3 e 4 (Figura 13 A e B). Estes apresentaram um parênquima hepático constituído por hepatócitos com padrão regular e estrutura típica.

Nos controlos positivos (Figura 13 C e D) observaram-se profundas alterações da morfologia: um parênquima irregular, heterogéneo, com manchas vermelhas, mais claras, rodeadas por tecido mais escuro, púrpura, com hemorragias, vacuolização e hepatócitos desintegrados. As veias hepáticas surgiram, normalmente, congestionadas, o que terá dificultado a oxigenação e o fornecimento de nutrientes aos hepatócitos e consequentemente todo o funcionamento do fígado. Estas observações estão de acordo com os efeitos histopatológicos do CCl₄ observados por vários autores^{15, 22, 26, 34}.

A agressividade do tóxico foi elevada em ambos os grupos de controlo positivo. Empiricamente, foram observadas lesões hepáticas mais óbvias e graves no grupo 2 (Figura 13 D), particularmente a nível da vacuolização e do congestionamento das veias hepáticas.

Estas observações reflectem as diferenças entre os grupos 1 e 2 observadas nos ensaios anteriormente referidos. No entanto, pela maior quantidade de Alb e de TP registadas no plasma sanguíneo e a maior actividade da GST analisada no fígado do grupo 2, previa-se o oposto, ou seja, lesões histopatológicas hepáticas mais evidentes no grupo 1 do que no grupo 2.

Este resultado comprova a importância da análise histológica, uma vez que nem sempre os marcadores sanguíneos e enzimáticos revelam com clareza o estado morfológico e funcional do órgão em estudo.

Observou-se uma recuperação considerável no parênquima dos animais dos grupos tratados com tóxico seguido do extracto vegetal (Figura 14 A e C), em relação aos respectivos controlos positivos. Contudo, o mesmo não se verificou nos grupos pré-tratados com o extracto (Figura 14 B e D).

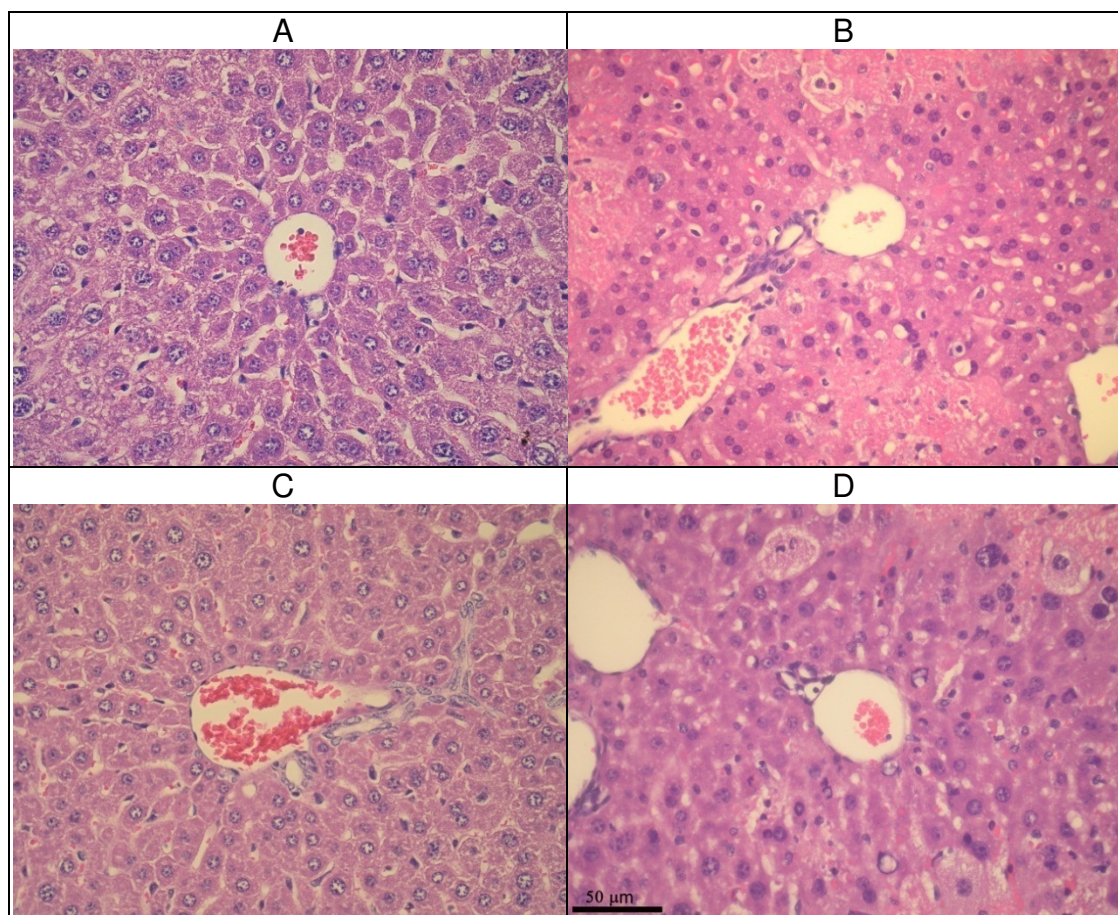


Figura 14 - Efeito do extracto de cipselas de *C. intybus* na histologia hepática, em intoxicação por CCl₄. (HE, 400x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.

Em termos de arquitectura geral, em A e C verificou-se uma atenuação dos danos histopatológicos, com redução da frequência de hemorragias, necrose hepatocelular e vacuolização, sendo perceptíveis os cordões de hepatócitos, que mantiveram uma estrutura geométrica normal, na sua maioria. O congestionamento do espaço centrolobular ou da veia-porta raramente foi observado. Não foram observadas diferenças óbvias em B e D relativamente aos grupos de controlo positivo, pelo que o tratamento com o extracto foi ineficaz no tecido hepático dos animais destes grupos.

Os espécimes foram, também, submetidos à técnica histoquímica do Tricrómio de Masson. Esta coloração permite identificar doenças crónicas que afectem o tecido conjuntivo e em particular fibras de colagénio. O citoplasma, queratina e fibras musculares e intercelulares são corados de vermelho, o colagénio de azul e os núcleos de preto/azul escuro.

Nesta coloração (Figura 15) observou-se evidente fibrose periportal em D e total desintegração nuclear e citoplasmática em C, com a ocorrência de fibras no espaço intercelular. Embora a estrutura do tecido conjuntivo fosse normal, surgiram alguns halos perinucleares (B).

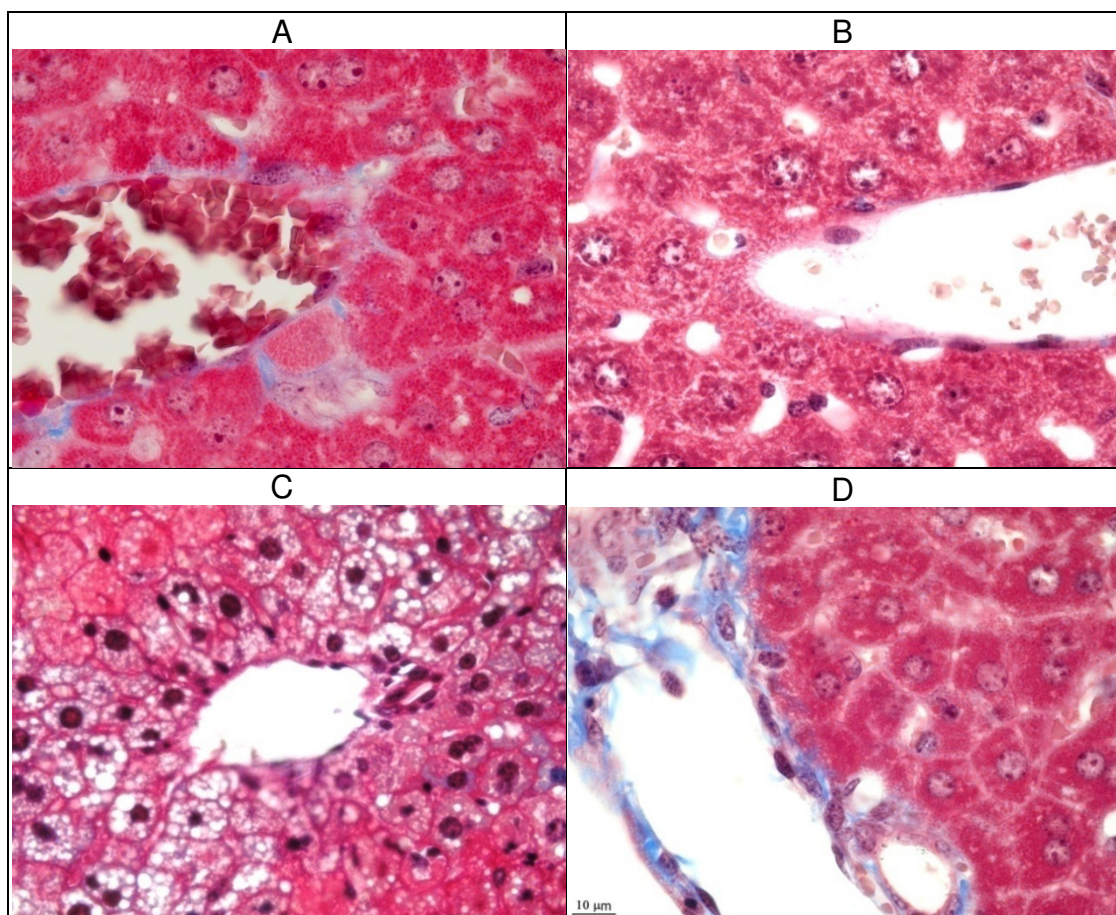


Figura 15 - Efeito dos compostos a seguir indicados no fígado (TM, 1000 x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cípselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (C) CCl₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl₄ [1,0 ml/kg].

A Figura 16 apresenta uma recuperação significativa em (C). Nos restantes grupos, predominam os núcleos pré-picnóticos e citoplasma laxo. É, assim, evidente a desorganização e infiltração do tecido conjuntivo no parênquima hepático, pelo que o extracto vegetal não conseguiu contrariar ou prevenir eficazmente os efeitos do CCl₄.

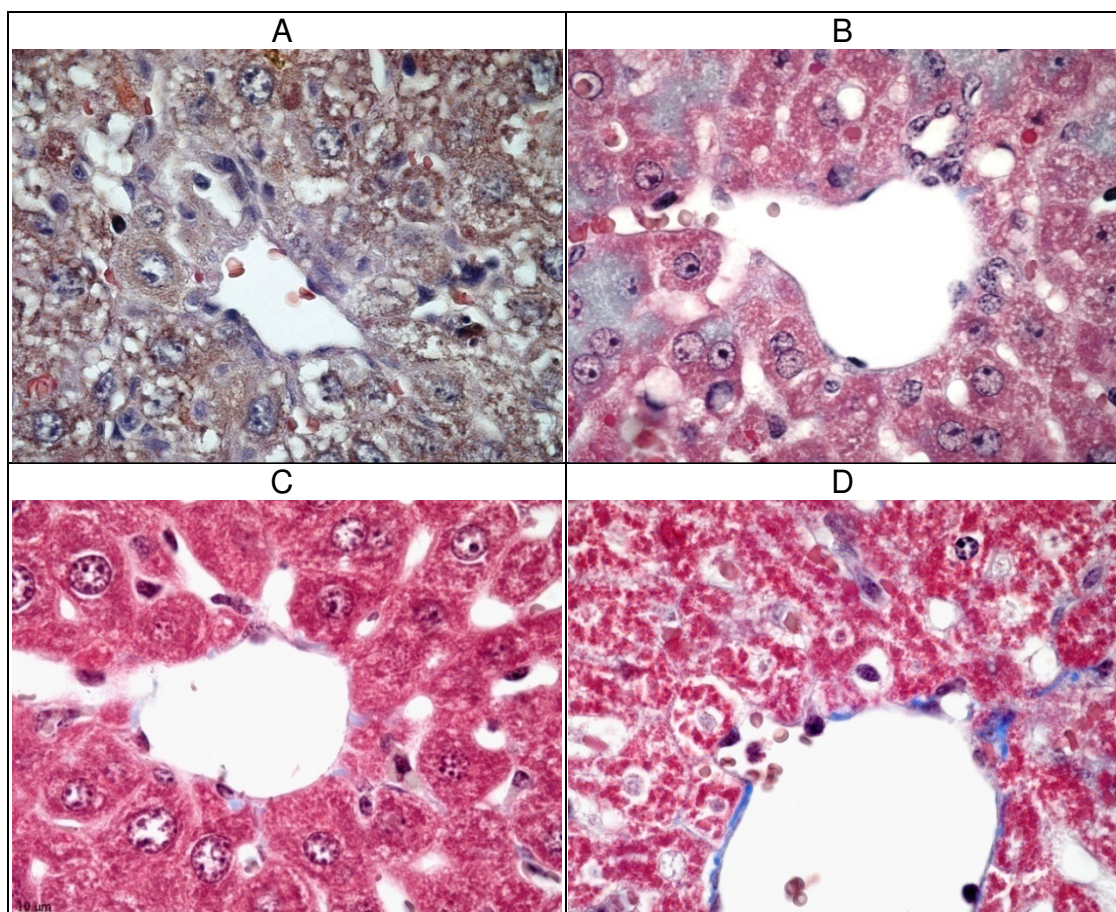


Figura 16 - Efeito do extracto de cipselas de *C. intybus* no fígado, em intoxicação por CCl_4 . (TM, 1000 x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.

Portanto, verifica-se que o extracto em estudo poderá possuir propriedades regeneradoras (mas não protectoras) do tecido hepático. No entanto, as observações efectuadas não sugerem uma recuperação relevante como a descrita por Ahmed *et al*^{15, 30}. Deve-se considerar as resistências individuais aos efeitos do CCl_4 que poderão modelar os resultados obtidos.

III.7.2. Rim

O rim, pelo seu papel na bio-transformação e excreção, constitui um órgão alvo de uma grande variedade de tóxicos, sendo normalmente o nefrónio o principal alvo. Contudo, não se conhece qualquer documentação do efeito do extracto de *C. intybus* no rim.

As Figura 17 e Figura 18 apresentam os resultados das observações de secções de rim dos animais dos vários grupos.

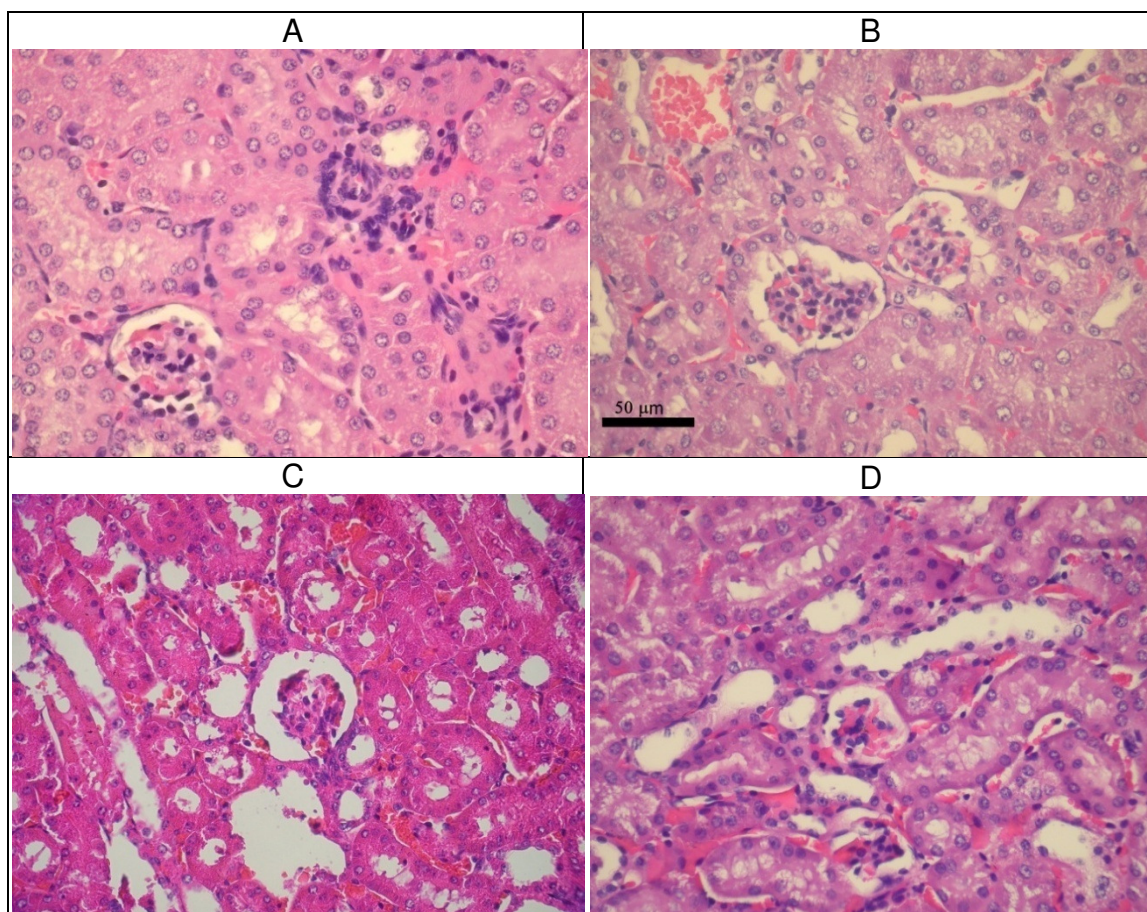


Figura 17 - Efeito dos compostos a seguir indicados nas fibras renais (HE, 400 x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (C) CCl₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl₄ [1,0 ml/kg].

No controlo negativo (A) e no grupo injectado com o extracto (B), a morfologia renal apresentou-se maioritariamente normal, com glomérulos normais, túbulos compactos, arredondados e por vezes com o epitélio fino mas não dilatados ou danificados. Em B, contudo, surgiram pequenos focos hemorrágicos esporádicos. Nos grupos expostos ao CCl₄ (Figura 17 C e D), a dilatação dos túbulos foi evidente, bem como a grande desintegração do epitélio destes; os glomérulos surgiram diminuídos e/ou em desintegração, bem como apenas restos da sua existência em locais onde a sua desintegração é total; a ocorrência de múltiplas hemorragias e vacúolos foi evidente.

Nos tratamentos (Figura 18) não se verificaram melhorias significativas, em comparação com o CCl_4 , na generalidade do tecido renal. As hemorragias, vacúolos, desintegração nuclear e dilatação dos túbulos permaneceram evidentes. A degradação dos glomérulos foi, contudo, menos observada.

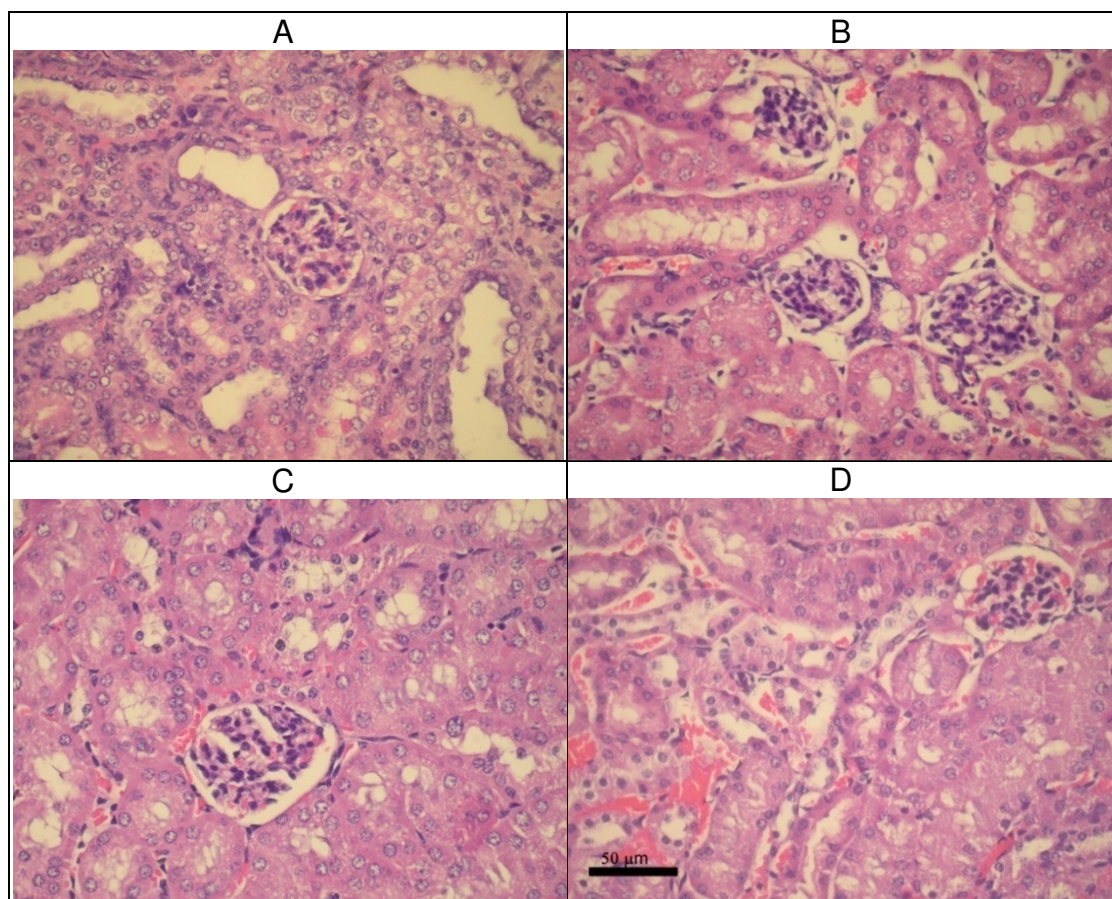


Figura 18 - Efeito do extracto de cipselas de *C. intybus* nas fibras renais, em intoxicação por CCl_4 . (HE, 400x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.

Usou-se a técnica histoquímica do Tricrómio de Masson para evidenciar fibroses renais, em particular nos glomérulos e em torno das veias. Imagens das observações efectuadas estão representadas na Figura 19 (controlos) e na Figura 20 (tratamentos).

Nos grupos de controlo negativo e da chicória (Figura 19 A e B) a distinção entre zona cortical e zona medular foi evidente. Os glomérulos e túbulos apresentaram-se morfológicamente normais. Nos controlos positivos (Figura 19 C e D), não foi possível distinguir a zona cortical da medular. Observaram-se túbulos dilatados de

epitélio vacuolizado e diminuição dos glomérulos. Em C, foram observadas fibras em torno das artérias interlobulares, embora em desintegração. Surgiram fibras intersticiais e manchas de cor acastanhada em várias zonas do rim, em particular na região próxima dos glomérulos. Em D, as fibras intercelulares foram menos frequentes, mas a desintegração dos núcleos foi evidente.

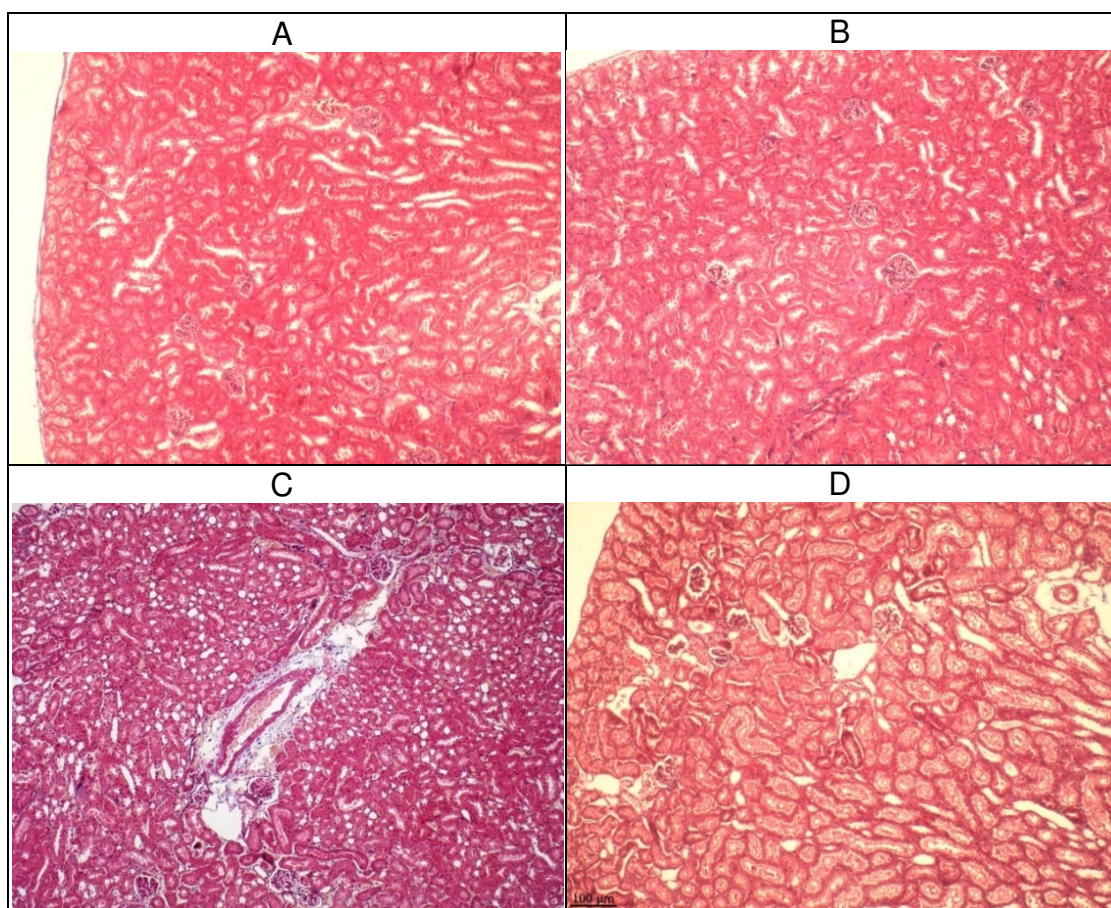


Figura 19 - Efeito dos compostos a seguir indicados nas fibras renais (TM, 100 x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (C) CCl₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl₄ [1,0 ml/kg].

Os grupos de tratamento (i.e. sujeitos ao tóxico e ao extracto) - Figura 20 – não apresentaram diferenças significativas em relação ao correspondente grupo de controlo positivo.

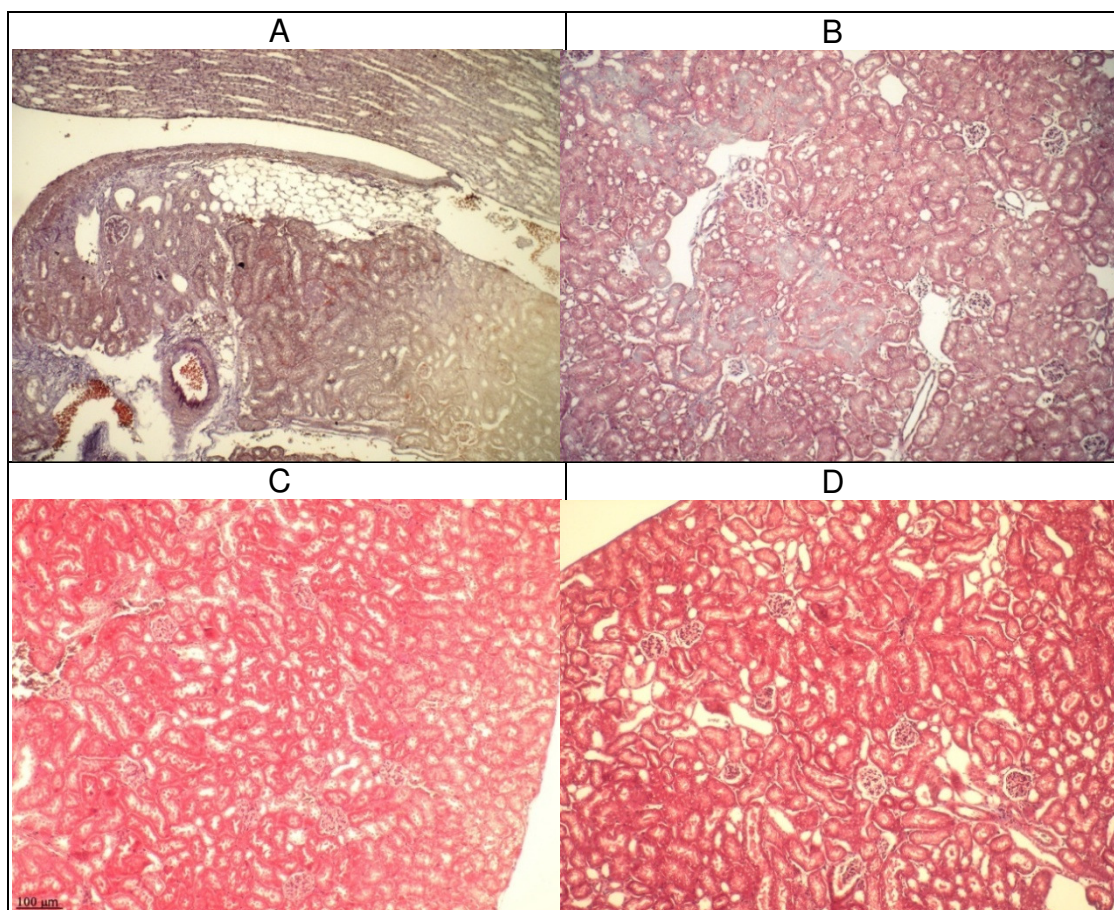


Figura 20 - Efeito do extracto de *C. intybus* nas fibras renais, em intoxicação por CCl_4 (TM, 100 x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.

O extracto em estudo não evidenciou efeitos protectores ou regeneradores significativos a nível da histologia renal.

III.7.3. Baço

O controlo negativo do baço revelou uma histologia normal (Figura 21 A), evidenciando a polpa branca regular e distinta da polpa vermelha. O mesmo se observou em B. Nos órgãos dos animais expostos ao CCl_4 (C e D), toda a estrutura surgiu alterada, inclusive a nível dos seios venosos que atravessam a polpa vermelha. Muitas das arteríolas apresentavam-se congestionadas e surgiram células-gigantes em grande número, particularmente nas zonas próximas das trabéculas e dos nódulos conjuntivos. A maior alteração foi observada no centro germinativo, com a ocorrência evidente de inúmeros halos perinucleares nas células imunitárias, tendo-se, também, observado muitos linfócitos em desintegração.

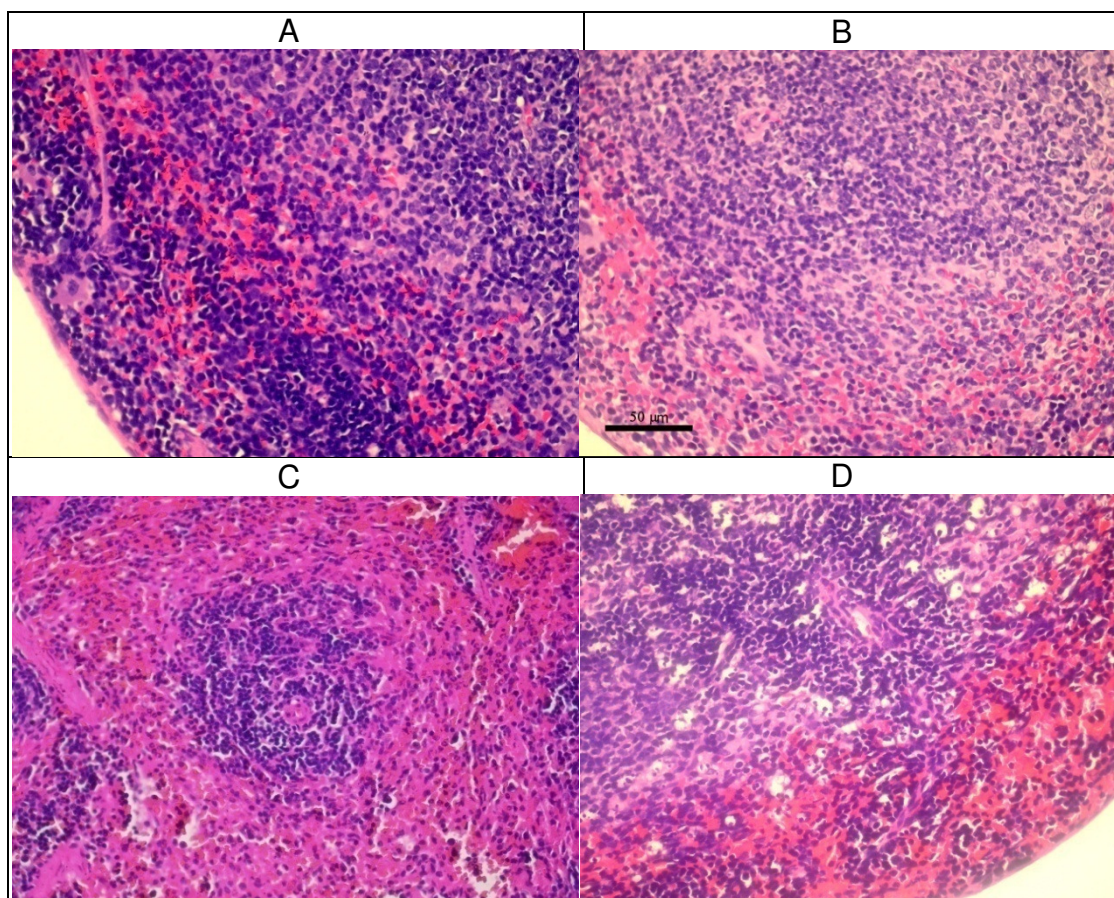


Figura 21 - Efeito das substâncias a seguir indicadas, na histologia do baço (HE, 400 x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (C) CCl₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl₄ [1,0 ml/kg].

Tal como se pode verificar na Figura 22, o baço de animais dos grupos 5-8 não apresentou alterações significativas em relação ao tóxico, independentemente do momento de exposição ao extracto vegetal. Contudo, a desintegração linfocitária foi menos visível, observando-se ainda maior número de células-gigantes, o que poderá evidenciar a sua acção. Nos controlos positivos (Figura 21 C e D) observou-se menor incidência de células gigantes. Não se observaram alterações na cápsula.

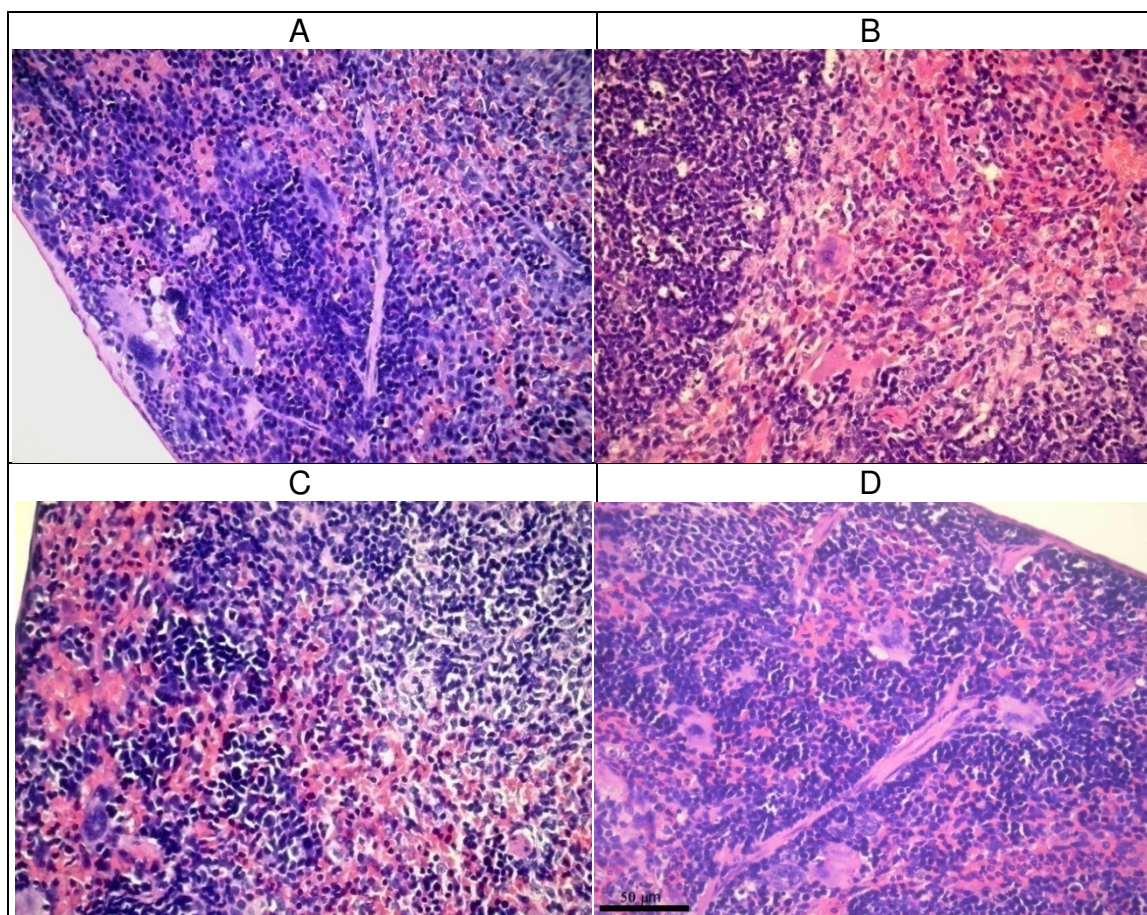


Figura 22 - Efeito do extracto cipselas de *C. intybus* na histologia do baço, em intoxicação por CCl_4 (HE., 400x). (A) Grupo 5; (B) Grupo 6; (C) Grupo 7; (D) Grupo 8.

III.7.4. Testículo

A documentação sobre o efeito de extractos vegetais no sistema reprodutor masculino é ainda escassa. Assim, procedeu-se também à observação de secções de testículo e (Figura 23) de epidídimo (III.7.5 - Figura 25).

A arquitectura testicular surgiu alterada nos grupos sujeitos ao CCl_4 (Figura 23 C e D) e no grupo apenas exposto ao extracto (B). Nas secções de testículo dos animais submetidos ao extracto observaram-se alterações histológicas, nomeadamente vacúolos intraepiteliais de dimensão apreciável. O tecido intersticial surgiu diminuído, assemelhando-se a C. Também se observou, pontualmente, disrupção do epitélio seminífero, necrose das espermatídes e restos celulares no lúmen.

As diferentes doses de tóxico resultaram também em diferentes efeitos na histologia. Em C a característica mais marcada foi a incidência de células imaturas no lúmen do túbulo e a diminuição do tecido intersticial. Em D verificou-se hemorragia,

desorganização celular, exfoliação das células germinativas e acumulação de caudas no lúmen do túbulo.

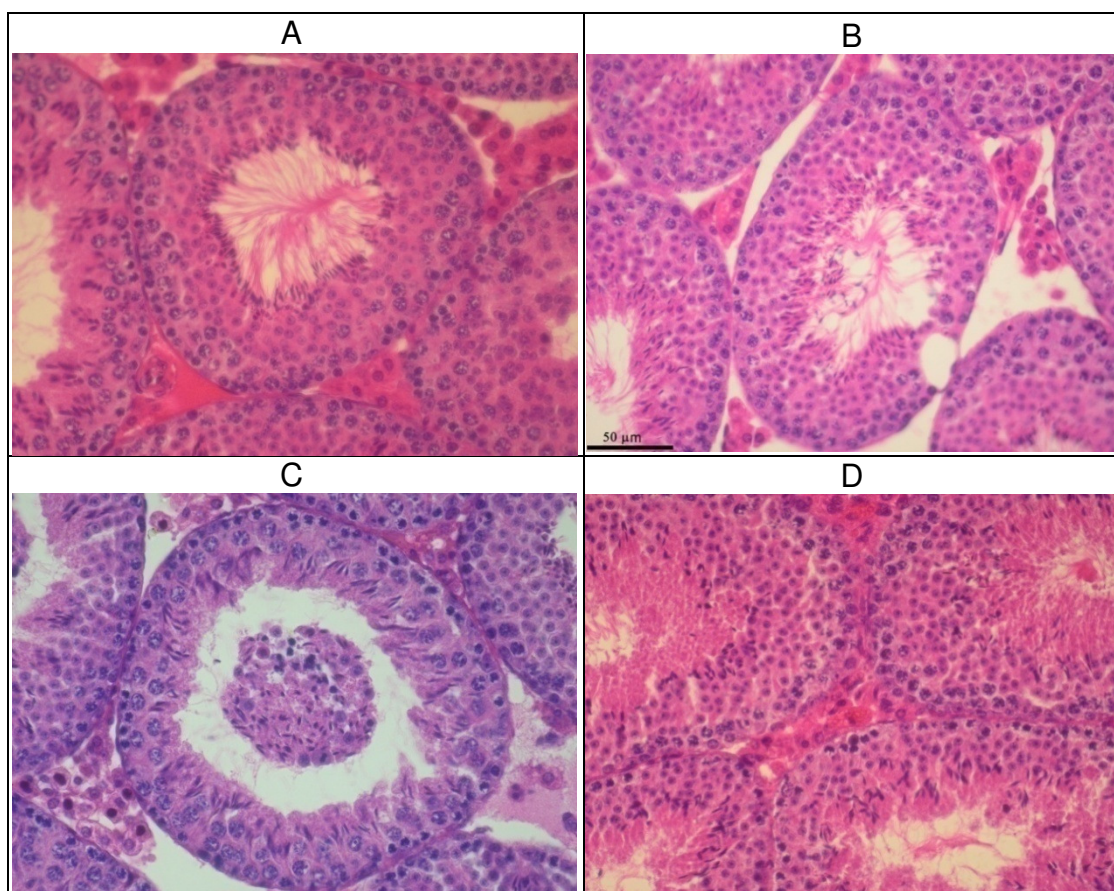


Figura 23 - Efeito das substâncias a seguir indicadas, na histologia do testículo (HE., 400x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipselas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (C) CCl₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl₄ [1,0 ml/kg].

O extracto usado não só não diminuiu a toxicidade do CCl₄ no testículo como também induziu lesões no mesmo.

III.7.4.1. Diâmetro dos túbulos seminíferos

Como método complementar para avaliar o efeito do extracto no testículo, procedeu-se à determinação do diâmetro dos túbulos seminíferos, para todos os grupos, um método também usado por Singh *et al* (2009)⁴⁵. Na Figura 24, pode-se constatar que, tal como o verificado noutros órgãos, a dose de CCl₄ de 1,0 ml/kg sugere ter efeitos mais proeminentes do que o mesmo tóxico em dose de 1,5 ml/kg. O grupo 3

apresentou menor diâmetro dos túbulos seminíferos. No entanto, estatisticamente, apenas o grupo 5 surge como significativamente diferente dos grupos 3 de 8.

Portanto, no estudo efectuado não se encontraram diferenças significativas no diâmetro dos túbulos seminíferos dos controlos positivos e do controlo negativo e destes em relação ao grupo apenas tratado com o extracto vegetal. De notar, contudo, o diâmetro tendencialmente maior nos grupos tratamento 5-7. Tal resultado poderá indicar que o extracto vegetal poderá levar a um incremento dos efeitos negativos provocados pelo CCl_4 .

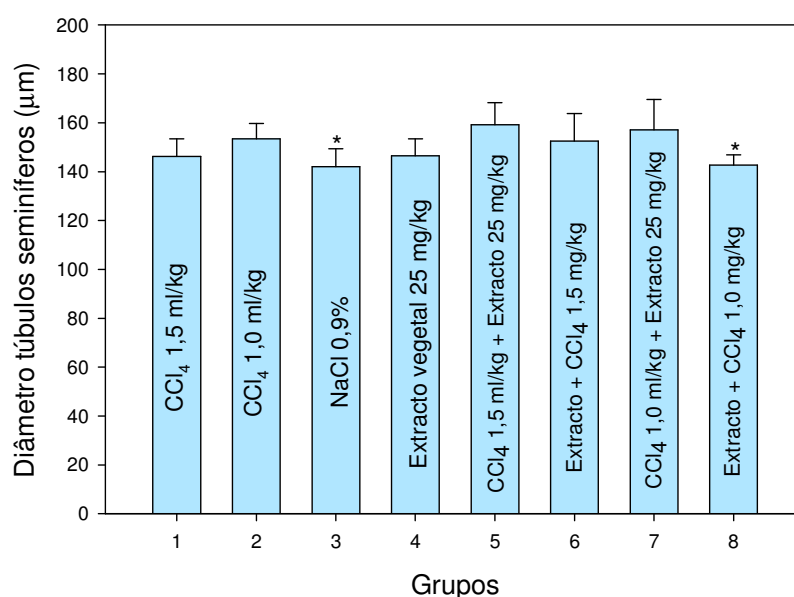


Figura 24 - Efeito dos diferentes tratamentos no diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais dos vários grupos. Os valores correspondem a média \pm desvio-padrão com $n=5$ ($n=1$ no grupo 7). * Significativamente diferentes do grupo 5 ($p \leq 0,05$)

III.7.5. Epidídimo

Sendo o epidídimo um importante órgão de armazenamento e de maturação dos espermatozóides, a sua análise deve acompanhar a do testículo e vice-versa.

Os túbulos de A e B (Figura 25) surgiram, na sua maioria, com inúmeros espermatozóides no lúmen enquanto que os túbulos de C e D surgiram, maioritariamente, vazios.

No epitélio do epidídimo, assim como no tecido circundante, também se observaram vacúolos. Os danos provocados pelo CCl_4 revelaram-se mais acentuados na dose mais elevada. Observaram-se, também, alterações na coloração do muco do lúmen

tubular, que poderão indicar modificações na sua viscosidade e/ou na sua composição.

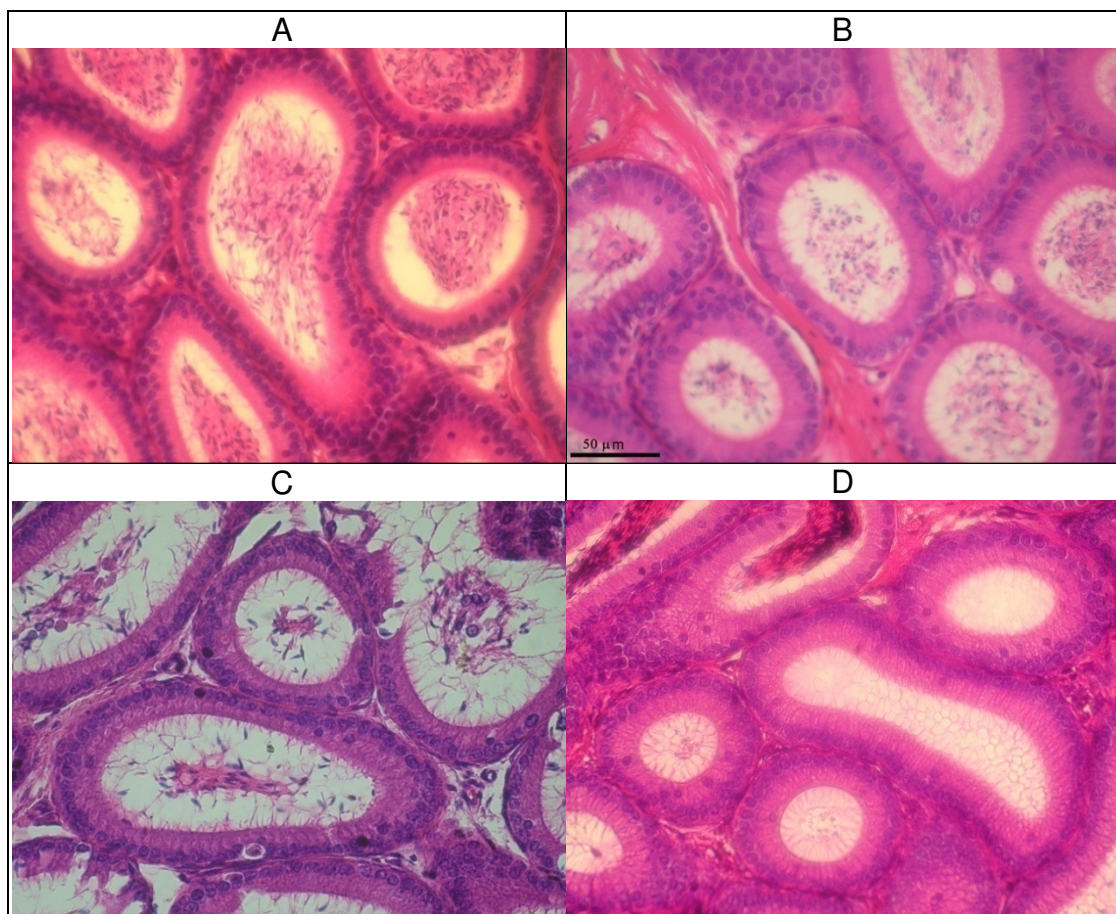


Figura 25 - Efeito das substâncias a seguir indicadas, na histologia do epidídimo (HE, 400x). (A) NaCl 0,9%; (B) Extracto de cipelas de *C. intybus* [25 mg/kg]; (C) CCl₄ [1,5 ml/kg]; (D) CCl₄ [1,0 ml/kg].

O extracto vegetal em estudo provocou alterações histológicas mensuráveis no testículo e no epidídimo. Estes dados sugerem alterações da barreira hemato-testicular.

Capítulo IV – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Capítulo IV – Discussão geral e Conclusões

A ampla utilização das medicinas alternativas e complementares pela população mundial veio levantar várias questões de segurança. Apesar da sua fácil acessibilidade e uso generalizado podem provocar sérios efeitos secundários.

As várias técnicas usadas neste trabalho mostraram-se úteis mas limitadas para compreender os efeitos do extracto de cipselas (frutos) de *C. intybus*.

A literatura consultada não permitiu reconhecer uma razão para as diferenças observadas nos controlos positivos, tanto histologicamente como a nível dos marcadores bioquímicos estudados.

Os ensaios bioquímicos não permitiram concluir objectivamente sobre os potenciais efeitos benéficos do extracto vegetal. No entanto, a observação das secções histológicas de fígado sugerem o potencial regenerador do extracto. O potencial protector do extracto não ficou patente. O extracto vegetal não demonstrou efeitos regeneradores ou protectores mensuráveis tanto no rim como no baço.

Foram detectadas lesões a nível da histologia do testículo e do epidídimo, provocadas pelo extracto. São necessários novos estudos para detectar os mecanismos inerentes a essa toxicidade, em particular a nível da barreira hemato-testicular.

As várias análises efectuadas, inclusive a análise do rácio órgão/massa corporal, sugerem que os efeitos do extracto divergem entre os diferentes órgãos estudados e são afectados pela dose de CCl_4 usada. O controlo feito com o extracto também sugere que este não será inócuo reagindo bioquimicamente com os metabolitos presentes no ambiente celular.

Os efeitos observados, quer ao nível bioquímico quer histológico, resultam provavelmente de interacções e sinergismos entre os diferentes compostos e os metabolitos presentes nos tecidos.

As vantagens e desvantagens de usar o extracto *versus* o seu composto activo individualmente devem ser, constantemente, consideradas.

Os compostos vegetais podem interagir com outras drogas e/ou conter quantidades significativas de minerais e de metais. Por esta razão, torna-se imprescindível considerar outros factores tais como a origem da planta, o modo de preparação do extracto, a dose e a duração do tratamento.

Capítulo V – PERSPECTIVAS FUTURAS

Capítulo V – Perspectivas Futuras

O crescente interesse em produtos como aditivos e suplementos alimentares, deveria justificar um aumento de investimento na investigação dos reais e potenciais contributos das plantas para a saúde humana.

C. intybus, é considerada hepatoprotectora por vários autores, mas não existe uniformização nos protocolos estudados, quer a nível do método de extracção ou dos modelos animais usados.

Deve-se determinar a sua constituição química exacta e/ou das suas diferentes partes (folhas, flores, cipselas, raiz), e detectar as diferenças na constituição consoante o ambiente em que a planta se encontra, uma vez que se trata duma planta espontânea e que foi referida por Aksoy (2008)⁷² como possível indicador de poluição por metais.

Em nenhum dos trabalhos consultados foi considerada a possível sinergia existente entre os vários compostos presentes na planta e/ou no seu extracto.

Os mecanismos de actuação do extracto, bem como a influência do seu metabolismo e absorção gastrointestinal nos resultados anatómico-patológicos e enzimáticos/anti-oxidantes finais, são desconhecidos. De realçar, que apesar da importância que tem sido atribuída aos testes *in vitro*, estes não consideram a questão anteriormente referida. São, no entanto, úteis para o estudo dos mecanismos de acção de substâncias.⁵⁹

São necessárias ensaios mais abrangentes e com mais réplicas que pesquisem outros marcadores plasmáticos e outras moléculas antioxidantes e/ou noutros órgãos.

Testes de fertilidade, espermogramas e testes à integridade do acrossoma contribuiriam para um maior conhecimento da toxicidade e/ou efeito anti-fertilidade desta planta.

Considerando as diferenças de reacção aos extractos vegetais entre machos e fêmeas registadas por Schmidt *et al* (2006)³⁶, seria, também, útil recorrer a indivíduos do sexo feminino e a outros métodos e tempos de exposição ao extracto.

O estudo dos efeitos do extracto a nível do genoma e da sua bioactivação e/ou expressão seria, também, uma abordagem interessante.

Capítulo VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo VI - Referências Bibliográficas

- 1 Cunha AP., Silva AP., Roque OD., 2006, "Plantas e produtos vegetais em fitoterapia", 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 9-26
- 2 Krishna Mohan G., Pallavi E., Ravi Kumar B., Ramesh M., Venkatesh S., 2007, "Hepatoprotective activity of *Ficus carica* Linn. leaf extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats", DARU - Journal of Faculty of Pharmacy Teheran University of Medical Sciences 15 (3): 162-166
- 3 Myers SP., Cheras PA., 2004, "The other side of the coin: safety of complementary and alternative medicine", The Medical Journal of Australia 181 (4): 222-225
- 4 Verma S., Thuluvath PJ., 2007, "Complementary and Alternative Medicine in Hepatology: Review of the evidence of efficacy", Clinical Gastroenterology and Hepatology 5 (4): 408-416
- 5 Spinella M., 2002, "The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines", Alternative Medicine Review 7 (2): 130-137
- 6 Özbek Hanefi, Bayram I., Ugras S. and Cengiz N., 2006, "Investigation of hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* fixed oil in rats", Research Journal of Medicine and Medical Sciences 1 (2): 72-76
- 7 Peng, A., Y Gu, SY Lin, 2005, "Herbal Treatment for renal diseases", Annals Academy of Medicine 34 (1): 44-51
- 8 Ródes J., Benhamou JP., Blei AT., Reichen J., Rizzetto M., 2007, "Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice" Volume I, 3ª edição, Blackwell Publishing, pp: 1283-1286
- 9 Ernst E., 2002, "Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines", Trends in Pharmacological Sciences 23 (3): 136-139
- 10 Alwakeel SS., 2008, "Microbial and Heavy Metals Contamination of Herbal Medicines", Research Journal of Microbiology 3 (12): 683-691
- 11 Pradhan SC., Girish C., 2006, "Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine". Indian Journal of Medical Research 124 (5): 491 – 504
- 12 Dang Shuang-suo, Zhang Xin, Jia Xiao-li, Cheng Yan-an, Song Ping, Liu En-qi, He Qian, Li Zong-fang, 2008, "Protective effects of emodin and astragalus polysaccharides on chronic hepatic injury in rats", Chinese Medical Journal 121 (11): 1010 – 1014
- 13 Franco JM., 1984, Nova Flora de Portugal (Continente e Açores), Volume II, Escolar Editora, pp: 490-491

- 14** Gadgoli C., Mishra SH., 1997, "Antihepatotoxic activity of *Chicorium intybus*". Journal of Ethnopharmacology 58 (2): 131 – 134
- 15** Ahmed B., Al-Howiriny TA., Siddiqui AB., 2003, "Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*". Journal of Ethnopharmacology, 87 (2): 237-240.
- 16** Gupta SK., Sharma P., Ansari SH., Gupta MK., 2005, "Standardization of seeds of *Cichorium intybus* Linn.", Asian journal of Chemistry 17 (4): 2824-2826
- 17** Judzentienė A., Budienė J., 2008, "Volatile constituents from aerial parts and roots of *Cichorium intybus* L. (chicory) grown in Lithuania", CHEMIJA - Journal of Lithuania Academy of Science 19(2): 25-28
- 18** Ahmad B., Bawa S., Siddiqui AB., Alam T., Khan SA., 2002, "Components from seeds of *Cichorium intybus* Linn.", Indian Journal of Chemistry – Section B – Organic Chemistry including Medicinal Chemistry 41(12): 2701-2705
- 19** Tilford GL., 1997, "Edible and Medicinal Plants of the West", Mountain Press Publishing, Missoula, pp. 32-33
- 20** Petrovic J., Stanojkovic A., Comic LJ., Curcic S., 2004, "Antibacterial activity of *Cichorium intybus*", Fitoterapia 75 (7-8): 737-739
- 21** Aqil F., Ahmad I., 2003, "Broad – spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used Indian medicinal plants", World journal of Microbiology & Biotechnology 19 (6): 653-657
- 22** Zafar R., Mujahid Ali S., 1998, "Anti-hepatotoxic effects of root and root callus extracts of *Chicorium intybus* L.", Journal of Ethnopharmacology, 63 (3): 227-231
- 23** Hazra B., Sarkar R., Bhattacharyya S., Roy P., 2002, "Tumour inhibitory of chicory root extract against Ehrlich ascites carcinoma in mice", Fitoterapia 73 (7-8): 730-733
- 24** Gazzani G., Daglia M., Papetti A., Gregotti C., 1999, "In vitro and ex vitro anti- and prooxidant components of *Chicorium intybus*.", Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis 23 (1): 127-133
- 25** Papetti, A., Daglia M., Gazzani G., 2002, "Anti- and pro-oxidant activity of water soluble compounds in *Chicorium intybus* var. *Silvestre*", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30 (4): 939-945
- 26** Madani H., Talebolhosseini M., Asgary S., Naderi GH., 2008, "Hepatoprotective Activity of *Silybum marianum* and *Chicorium intybus* against thioacetamide in rat", Pakistan Journal of Nutrition 7 (1): 172-176.

- 27** Kocsis I., Hagymási K., Kéry Á., Szoöke É., Blázovics A., 2003, "Effects of chicory on pancreas status of rats in experimental dislipidemia", *Acta Biologica Szegediensis* 47 (1-4): 143-146
- 28** Nayeemunnisa, Rani MK., 2003, "Cardioprotective effects of *Cichorium intybus* in ageing myocardium of albino rats", *Current Science* 84 (7): 941-943
- 29** Gadgoli C., Mishra SH., 1997, "Antihepatotoxic activity of *Chicorium intybus*". *Journal of Ethnopharmacology* 58 (2): 131 – 134
- 30** Ahmed B., Khan S., Masood MH., Siddique AH., 2008, "Anti-hepatotoxic activity of cichotyboside from the seeds of *Cichorium intybus*", *Journal of Asian Natural Products Research* 10 (3): 218-223
- 31** Conforti F., Ioele G., Statti GA., Marrelli M., Ragno G., Menichini F., 2008, "Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants". *Food and Chemical Toxicology*, 46 (10): 3325-3332
- 32** Muthusamy VS., Anand S., Sangeetha KN., Sujatha S., 2008, "Tannins present in *Cichorium intybus* enhance glucose uptake and inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition", *Chemico-Biological Interactions* 174 (1): 69-78
- 33** Tusch D., Lajoix AD., Hosy E., Azay-Milhau J., Ferrare K., Jahannault C., Cros G., Petit P., 2008, "Chicoric acid a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377 (1):131-135
- 34** Jamshidzadeh A., Khoshnood MJ., Dehghabni Z., Niknahad H., 2006, "Hepatoprotective activity of *Cichorium intybus* L. leaves extract against carbon tetrachloride induced toxicity", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 5 (1): 41-46
- 35** Sadeghi H., Nikbakht MR., Izadpanah G., Sabzali S., 2008, "Hepatoprotective effect of *Cichorium intybus* on CCl4 induced liver damage in rats", *African Journal of Biochemistry Research* 2 (6): 141-144
- 36** Schmidt BM., Ilic N., Pouleva A., Raskin I., 2007, "Toxicological evaluation of a chicory root extract", *Food and Chemical Toxicology* 45 (7): 1131-1139
- 37** Sherlock S., Dooley J., 2002, "Diseases of the Liver and Biliary System", 11th Edition, Blackwell Science, pp: 1; 19-32; 47-62
- 38** Junqueira LC., Carneiro J., 2009, "Histologia Básica – Texto e Atlas", 11ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A. pp: 324-334; 371-373; 415-426
- 39** Balderas-Renteria I., Camacho-Corona MR., Carranza-Rosales P., Lozano-Garza HG., Castillo-Nava D., Alvarez-Mendoza FJ., Tamez-Cantú EM., 2007,

“Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride”, *Annals of Hepatology* 6 (4): 251 – 254

40 Eminzade S., Uraz F., Izzettin FV., 2008, “Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals”, *Nutrition and Metabolism* 5 (1): 18-26

41 Sethuraman MG., Lalitha KG., Kapoor BR., 2003, “Hepatoprotective activity of *Sarcostemma brevistigma* against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats”, *Current Science* 84 (9): 1186-1187

42 Haschek WM.; Rousseaux CG., 1998, “Fundamentals of Toxicologic Pathology”, 2ª edição, Academic Press Inc. California, pp: 154-159; 222-224; 244-247; 443-444

43 Stevens A., Lowe JS, Young B., 2002, “Wheater’s Basic Histopathology – a colour atlas and text”, 4ª edição, Churchill Livingstone, pp: 165-175

44 Cesta MF., 2006, “Normal structure, function and histology of the Spleen”, *Toxicologic Pathology* 34 (5): 455-465

45 Singh A., Singh SK., 2009, “Evaluation of antifertility potential of Brahmi in male mice”, *Contraception* 79 (1): 71-79

46 Lee Chia-Pu, Shih Ping-Hsiao, Hsu Chin-Lin, Yen Gow-Chin, 2007, “Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl₄-induced oxidative damage in rats”, *Food and Chemical Toxicology*, 45 (6): 888-895

47 Premila Abraham P., Wilfred G., 1999, “Decreased activity of hepatic alkaline protease in rats with CCl₄ induced liver cirrhosis”, *Indian Journal of Experimental Biology*, 37 (12): 1243-1244

48 Alexeeff GV., 1987, “Report to the air resources board on carbon tetrachloride – Part B: Health effects of carbon tetrachloride”, California Department of Health Services (CDHS) – Epidemiological Studies Section

49 Mestas J., Hughes CCW., 2004, “Of mice and not men: Differences between Mouse and Human Immunology”, *The Journal of Immunology* 172 (1): 2731-2738

50 Thrall KD., Vucelick ME., Gies RA., Zangar C., Weitz KK., Poet TS., Springer DL., Grant DM., Benson JM., 2000, “Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice and hamsters using gas uptake and PBPK modeling”, *Journal of Toxicology and Environmental Health, part A*, 60 (8): 531-548

51 Martignoni M., Groothuis GMM., Kanter R., 2006, “Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human cytochrome P450-mediated drug metabolism”, adapted from Expert Opinion on Drug metabolism and Toxicology 2 (6): 875-894

- 52** Nogueira CW., Borges LP., Souza ACG., 2009, "Oral administration of diphenyl diselenide potentiates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats", *Journal of Applied Toxicology* 29 (1): 156-164
- 53** Fort FL., 1992, "Correlation of Microtox EC sub(50) with mouse LD sub(50)", *In Vitro Toxicology* 5 (2): 73-82
- 54** Kaiser KL., McKinnon MB., Fort FL., 1994, "Interspecies toxicity correlations of rat, mouse and *Photobacterium phosphoreum*", *Environmental Toxicology and Chemistry* 13 (10): 1599-1606
- 55** Kaiser KL., "Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms". *Environmental Health Perspectives* 106 (2): 583-591, 1998
- 56** Burton SA., Petersen RV., Dickman SN., Nelson JR., 1986, "Comparasion of in vitro bacterial bioluminescence and tissue culture bioassays and in vivo tests for evaluating acute toxicity of biomaterials", *Journal of Biomedical Materials Research* 20 (6): 829-838
- 57** Yen Ming-Hong, Weng Ting-Chun, Liu Sin-Yie, Chai Chee-Yin, Lin Chun-Ching, 2005, "The hepatoprotective effect of *Bupleurum kaoi*, and endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats", *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28 (3): 442-448
- 58** Halliwell B., 2007, "Biochemistry of oxidative stress", *Biochemical Society Transactions* 35 (1): 1147-1150
- 59** Lima, Cristóvão Fernando Macedo, 2006, "Effects of *Salvia officinalis* in the liver: Relevance of glutathione levels", Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade do Minho
- 60** Ruch RJ., Klaunig JE., Schultz NE., Askari AB., Lacher DA., Pereira MA., Goldblatt PJ., 1986, "Mechanisms of chloroform and carbon tetrachloride toxicity in primary cultured mouse hepatocytes", *Environmental Health Perspectives* 69 (1): 301-305
- 61** Silva, EC., Silva OC., Figueira E., 2005, "Trabalhos práticos de Bioquímica e Metabolismo I", pp. 11, 17
- 62** Halliwell B., Whiteman M., 2004, "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?", *British Journal of Pharmacology* 142 (2): 231-255
- 63** Halliwell B., 1999, "Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept", *Nutrition Reviews* 57 (4): 104-113
- 64** Guevara MA., Silva A., Oliveira H., Pereira ML., Morgado F., 2003, "Segmentation and morphometry of histological sections using deformable models: A new tool for evaluating testicular histopathology", *Lecture notes in computer science* 2905 (1): 282-290

- 65** Aebi, H., 1984, "Catalase *in vitro*", Methods in Enzymology: Oxygen Radicals in Biological Systems 105 (1): 121 – 126
- 66** Habig WH., Pabst MJ., Jakoby WB., 1974, "Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation", Journal of Biological Chemistry 249 (1): 7130-7139.
- 67** Jayasekhar P., Mohanan PV., Rathinam K., 1997, "Hepatoprotective activity of ethyl acetate extract of *Acacia catechu*", Indian Journal of Pharmacology, 29 (6): 426 –428.
- 68** Jeong TC., You HJ., Park SJ., 2002, "Hepatoprotective effects of 18- glycerrheinic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression", Pharmacological Research, 46 (1): 221-227.
- 69** Gupta V., Gill KD., 2000, "Influence of ethanol on lead distribution and biochemical changes in rats exposed to lead", Alcohol 20 (1): 9–17
- 70** Kähkönen MP., Hopia AI., Vuorela HJ., Rauha JP., Pihlaja K., Kujala TS., Heinonen M., 1999, "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds". Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (10): 3945-3962
- 71** Hayes JD., Pulford DJ., 1995, "The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I", Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30 (6): 445-520
- 72** Aksoy, A., 2008, "Chicory (*Cichorium intybus*): A possible biomonitor of metal pollution", Pakistan Journal of Botany 40 (2): 791-797